

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Massenspektrometrie-basierte Analyse der Tet-Interaktoren

Andrea Friederike Künzel
aus
Weilheim i.OB, Deutschland

2017

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den

(Andrea Künzel)

Dissertation eingereicht am: 16.06.2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachter: PD Dr. Stylianos Michalakis

Mündliche Prüfung am: 19.07.2017

"Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört."

- Justus von Liebig, "Chemische Briefe"

Danksagung

Das Leben ist eine Reise und als solche war die Promotion ein großer Teil davon. Und wie so viele der spannendsten Reisen war sie anstrengend, aber auch lohnend. Ich habe viel gelernt und nehme viel auf meine weitere Reise mit.

Daher will ich mich besonders bei Prof. Dr. Thomas Carell bedanken, der mir alles zur Verfügung gestellt hat, was man zur Bewerksstellung einer Promotion braucht. Auch all meinen Prüfern und insbesondere meinem Zweitprüfer Dr. Stylianos Michalakis möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Korrektur meiner Arbeit danken.

Für die finanzielle Unterstützung der Reise durch ein Stipendium bedanke ich mich bei der Peter und Traudl Engelhorn-Stiftung. Der Life Science Munich Graduate School danke ich für die intellektuelle sowie finanzielle Unterstützung und Ausbildung.

Besonderer Dank gebührt auch meinen Eltern und meiner ganzen Familie, die mich schon mein ganzes Leben begleiten und unterstützen. Sie haben meine Reise erst möglich gemacht (im wahrsten Sinne des Wortes). Insbesondere schätze ich, dass sie mich gelehrt haben, Dinge kritisch zu hinterfragen.

Danke auch an die wichtigste Person in meinem Leben, die mich bereits auf etlichen meiner Reisen begleitet hat und mich an das Wesentliche erinnert, wenn die Reise ungeplant verläuft.

Eine Reise ist nur so gut wie die Gesellschaft. Deshalb möchte ich dem gesamten Arbeitskreis für die freundschaftliche Atmosphäre danken. Eine helfende Hand musste ich nie lange suchen.

Mein Reisebericht ist im Folgenden zusammengefasst. Ich hoffe, es dient dem ein oder anderen als Reiseführer und Inspiration!

So, und jetzt wäre eine Erholungsreise nicht schlecht.

Publikationsliste

Publikationen:

- [1] F. R. Traube*, A. F. Künzel*, E. Parsa, A. S. Geserich, A. Kirchner, K. Iwan, R. Rahimoff, C. Scheel, V. Splith, M. Stadlmeier, T. Wildenhof, M. Müller, F. Spada, J. Cox, M. Biel, S. Michalakis[#], T. Carell[#], „*A network of metabolic enzymes controls Tet3 activity in the brain*“, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, in Review, **2017**.

- [2] A. F. Künzel*, F. R. Traube*, E. Parsa, M. Stadlmeier, D. Eisen, B. Hackner, A. Kirchner, M. Müller, F. Spada, J. Cox, T. Carell, „*The functional context of Tet1 and Tet3 in eu- and heterochromatin*“, *PLoS One*, in Revision, **2017**.

- [3] A. Perera, D. Eisen, M. Wagner, S. K. Laube, A. F. Künzel, S. Koch, J. Steinbacher, E. Schulze, V. Splith, N. Mittermeier, M. Müller, M. Biel, T. Carell, S. Michalakis, „*TET3 Is Recruited by REST for Context-Specific Hydroxymethylation and Induction of Gene Expression*“, *Cell Rep.*, **2015**, 11, 1-12.

Konferenzbeiträge:

- [1] **Posterpräsentation:** A. Künzel, F. Traube, T. Carell, „*Tête-à-TET: Elucidating the Interactome of Tet1 and Tet3*“. 15th Human Proteome Organization World Congress HUPO, Taipei, Taiwan, 2016.
- [2] **Posterpräsentation:** A. Künzel, M. Stadlmeier, T. Carell, „*Tête-à-TET – Elucidating the Interactome of the Tet Enzymes*“. European Summer School - Advanced Proteomics, Brixen, Italien, 2015.
- [3] **Vortrag:** „*The Tet Interactome or How To Make A Nice Volcano*“. LSM Retreat, Spitzingsee, 2015.
- [4] **Vortrag und Posterpräsentation:** „*Tête-à-Tet – Elucidating the interactome of the Tet enzymes*“. Harvard-LMU Young Scientists' Forum, München, 2015.
- [5] **Posterpräsentation:** A. Künzel, T. Carell, „*Tête-à- Tête with Tets – Elucidating the Interactome of the Tet Enzymes*“. LSM Retreat, Frauenchiemsee, 2014.
- [6] **Posterpräsentation:** A. Künzel, T. Carell, „*Tête-à- Tête with Tets – Elucidating the Interactome of the Tet Enzymes*“. Computational Mass Spectrometry-Based Proteomics - MaxQuant Summer School, National Institutes of Health, Bethesda, USA, 2014.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
SUMMARY	3
1. EINLEITUNG.....	5
1.1. EPIGENETIK	5
1.1.1. Umstrukturierung des Chromatins	5
1.1.2. DNA-Methylierung	8
1.1.3. Modifizierte Cytosinbasen	9
1.1.4. DNA-Demethylierung	13
1.1.4.1. Aktiv-passive Demethylierung	14
1.1.4.2. BER-vermittelte aktive DNA-Demethylierung	14
1.1.4.3. Desaminase-vermittelte aktive Demethylierung.....	14
1.1.4.4. Enzymatische Entfernung der oxidierten Methylgruppe	15
1.2. TET-ENZYME	16
1.2.1. Katalytische Aktivität der Tet-Enzyme	17
1.2.2. Aufbau der Tet-Proteine	19
1.2.3. Tet1	23
1.2.3.1. Struktur von Tet1	23
1.2.3.2. Vorkommen von Tet1	23
1.2.3.3. Interaktionspartner von Tet1.....	24
1.2.4. Tet2	25
1.2.4.1. Struktur von Tet2	25
1.2.4.2. Vorkommen von Tet2	26
1.2.4.3. Interaktionspartner von Tet2.....	27
1.2.5. Tet3	27
1.2.5.1. Struktur von Tet3	27
1.2.5.2. Vorkommen von Tet3	28
1.2.5.3. Interaktionspartner von Tet3.....	29
1.2.6. Das Verhalten der Tet-Proteine während der Embryonalentwicklung.....	29
1.2.7. Rolle der Tet-Proteine in der Pathogenese	31
1.2.8. Regulation der Aktivität der Tet-Enzyme	33
1.3. PROTEOMIK-BASIERTE IDENTIFIZIERUNG VON INTERAKTIONSPARTNERN.....	36

1.3.1. Klassische Co-Immunpräzipitation zur Selektion der Interaktionspartner	36
1.3.2. <i>Shotgun</i> -Proteomik zur Identifizierung der Interaktionspartner	38
1.3.3. LFQ zur Quantifizierung der Interaktionspartner.....	39
2. ZIELSETZUNG	42
3. MATERIAL UND METHODEN.....	43
3.1. CHEMIKALIEN	43
3.2. ANTIKÖRPER.....	44
3.3. GERÄTE	49
3.4. BIOCHEMISCHE METHODEN	51
3.4.1. Zellkultur und Transfektion	51
3.4.1.1. Humane embryonale Nierenzellen (HEK293T-Zellen)	51
3.4.1.2. Murine embryonale Stammzellen (mESCs)	51
3.4.1.3. Neuronale Vorläuferzellen (NPCs)	51
3.4.2. Zellkernextraktpräparation	52
3.4.3. <i>Western Blot</i>	52
3.4.4. Immunhistochemie	53
3.4.5. Immunocytochemie	53
3.4.6. <i>Proximity Ligation Assay</i> (PLA)	54
3.4.6.1. PLA mit kultivierten Zellen	55
3.4.6.2. PLA mit histologischen Schnitten.....	56
3.4.7. RNA-Isolation	56
3.4.8. <i>Real-time quantitative polymerase chain reaction</i> (RT-qPCR)	57
3.4.9. <i>In-vivo</i> -Isocitrat-Experiment.....	57
3.4.10. <i>In-vitro</i> -Tet-Aktivitätstest.....	58
3.4.11. <i>In-vitro</i> -Aktivitätstest mit Inhibitoren	59
3.4.12. Co-Expression von Tet3 und Glud1 in HEK293T-Zellen.....	59
3.4.13. Synthese des Glud1-Inhibitors R162	60
3.4.14. Depolarisierung der Neuronen des Hippocampus.....	60
3.4.15. Co-Immunpräzipitation (Co-IP)	61
3.4.15.1. GFP-Tet-gesättigte Co-IP.....	61
3.4.15.2. Endogene Co-IP	62
3.4.15.3. Reverse Co-IP	62
3.5. MASSENSPEKTROMETRIE	64
3.5.1. Massenspektrometrische Analyse der Co-Immunpräzipitationsproben	64

3.5.2. Massenspektrometrische Datenauswertung	65
3.5.3. LFQ-Datenauswertung	65
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	66
4.1. VERÖFFENTLICHUNGEN	66
4.1.1. Der funktionelle Kontext von Tet1 und Tet3 im Eu- und Heterochromatin	66
4.1.1.1. Entwicklung einer GFP-Tet-gesättigten Co-IP zur Identifikation des Tet-Interaktoms.....	66
4.1.1.2. Übersicht über die Tet-Interaktoren in mESCs und NPCs.....	70
4.1.1.3. Das Interaktom von Tet1, Tet3 und Tet3 ^{-CXXC} in mESCs	72
4.1.1.4. Vergleich des Interaktoms von Tet1 in TKO-Zellen und mESCs.....	75
4.1.1.5. Das Interaktom von Tet3 und Tet3 ^{-CXXC} in NPCs.....	77
4.1.1.6. Vergleich der Interaktion von Chromatin-modifizierenden Proteinkomplexen mit Tet1, Tet3 und Tet3 ^{-CXXC}	78
4.1.1.7. Lokalisation von Tet3 im Heterochromatin	81
4.1.1.8. Diskussion	82
4.1.2. Ein Netzwerk metabolischer Enzyme kontrolliert die Tet3-Aktivität im Gehirn.....	84
4.1.2.1. Tet3 interagiert mit metabolischen Enzymen	86
4.1.2.2. Nachweis der Interaktionen und Lokalisation der Interaktoren	89
4.1.2.3. Funktionelle Untersuchung der Interaktion von Glud1 mit Tet3	92
4.1.2.4. Wirkung der Citratzyklus-Intermediate auf die Tet3-Aktivität	95
4.1.2.5. Diskussion	99
4.1.3. Tet3 wird von REST für kontext-spezifische Hydroxymethylierung und Induktion der Genexpression rekrutiert	102
4.2. UNVERÖFFENTLICHTE ARBEITEN	116
4.2.1. Das Tet2-Interaktom	116
4.2.2. Phosphorylierung der Tet-Enzyme beeinflusst deren Aktivität	122
4.2.3. Das Tet3 ^{-CXXC} -Interaktom in der Retina von Mäusen.....	127
5. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	129
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	132
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	137
8. ANHANG	167

Zusammenfassung

Die Epigenetik befasst sich mit den Mechanismen, durch die unterschiedliche Genexpressionsmuster auf Basis einer identischen DNA-Sequenz geschaffen und vererbt werden. Das Feld der Epigenetik konzentriert sich derzeit intensiv auf die Tet-Proteine. Diese sind in der Lage, die Methylierungsmuster der DNA zu verändern. Dieser Vorgang ist besonders spannend, da der Methylierungszustand wichtig für die epigenetische Regulation ist. Im Speziellen können die Tet-Enzyme die erst kürzlich entdeckten modifizierten Basen 5-Hydroxymethylcytosin, 5-Formylcytosin und 5-Carboxycytosin durch sukzessive Oxidation von 5-Methylcytosin generieren. Insbesondere während der Entwicklung und in unterschiedlichen Geweben sowie Organen variiert die Verteilung dieser modifizierten DNA-Basen. Ebenso verhält es sich mit der Produktion der einzelnen Tet-Proteine, von denen drei verschiedene Paraloge (Tet1-3) in Wirbeltieren identifiziert wurden.

Es stellt sich nun die Frage, warum drei unterschiedliche Tet-Enzyme nötig sind, um die gleiche katalytische Funktion auszuführen. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit die Interaktome der verschiedenen Tet-Proteine untersucht und miteinander verglichen. Hierzu wurde eine Tet-gesättigte Co-Immunpräzipitationsmethode entwickelt, um einen direkten und robusten Vergleich der Tet-Interaktome zu ermöglichen. Diese Affinitätsproteomik-Methode führte zur Aufklärung spezifischer Interaktionsprofile für Tet1 sowie Tet3 in murinen embryonalen Stammzellen (mESCs) und neuralen Vorläufern (NPCs). Interessanterweise wurden fast keine Interaktionspartner für Tet2 entdeckt. Für Tet1 und Tet3 hingegen konnten zahlreiche interagierende Proteine nachgewiesen werden, welche in die Regulation der Transkription und Replikation involviert sind. Eine besonders starke Interaktion wurde für Tet3 mit Chromatin-modifizierenden Proteinkomplexen wie NuRD, NuA4, PTW/PP1, FACT und SWI/SNF in mESCs, NPCs und Retinae von Mäusen festgestellt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Tet3 in Bereichen des Genoms aktiv wird, die einer Veränderung des Chromatins bedürfen. Tet1 hingegen könnte in Euchromatin arbeiten, da im Vergleich zu Tet3 signifikant weniger Mitglieder von Chromatin-modifizierenden Proteinkomplexen als Interaktoren angereichert waren (t-Test p-Wert = 0.0096). Tatsächlich bestätigten fluoreszenzmikroskopische Studien, dass Tet3 im Gegensatz zu Tet1 mit dem Heterochromatin colokalisiert. Folglich könnte der Unterschied zwischen den verschiedenen Tet-Proteinen unter anderem darin bestehen, zu unterschiedlich chromatinisierten Bereichen des Genoms Zugang zu haben.

Eine weitere ungeklärte Fragestellung ist, wie die Tet-Enzyme mit ihrem Cosubstrat α -Ketoglutarat versorgt werden. Bemerkenswert war daher die Identifizierung diverser metabolischer, mit dem

Citratzyklus assoziierter Enzyme im Interaktom von Tet3 im Gehirn von Mäusen. Mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationen, Lokalisationsstudien und *Proximity Ligation Assays* konnte gezeigt werden, dass Tet3 im Zellkern direkt mit Enzymen interagiert, die verschiedene biosynthetische Vorläufer von α -Ketoglutarat produzieren. Zudem konnte eine direkte Interaktion mit der Glutamatdehydrogenase (Glud1) nachgewiesen werden. Dieses Enzym kann den Neurotransmitter Glutamat direkt in α -Ketoglutarat umwandeln und stellt somit eine Zitronensäure-unabhängige Möglichkeit zur Versorgung mit α -Ketoglutarat dar.

Während die Interaktion von Glud1 mit Tet3 die Oxidation von mC zu hmC stimuliert, konnte gezeigt werden, dass die Metaboliten Oxaloacetat und Isocitrat inhibitorisch auf Tet3 wirken. Oxaloacetat und Isocitrat sind Intermediate des Citratzyklus und somit Vorläufer zur Biosynthese von α -Ketoglutarat. Diese Metaboliten scheinen das reaktive Fe^{2+} -Zentrum vor der Degradierung der DNA zu schützen, wenn das Tet-Enzym inaktiv ist. Diesen Effekt könnten die Metaboliten möglicherweise durch Koordinierung des Fe^{2+} -Zentrum erzielen.

Es ist bisher nicht im Detail geklärt, wie die Tet-Proteine und deren Oxidationsreaktionen reguliert werden. Im Rahmen dieser Dissertation konnte durch eine Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. Stylianos Michalakis gezeigt werden, dass der Transkriptionsrepressor REST mit Tet3 interagiert und seine Aktivität erhöht. REST scheint darüber hinaus Tet3 zu spezifischen Loci der DNA zu führen, um eine kontext-spezifische Hydroxymethylierung und somit eine Transkriptionsaktivierung zu erzeugen.

Nicht nur Interaktionspartner, sondern auch posttranslationale Modifikationen können die Enzymaktivität beeinflussen. Zur Analyse des Effekts von Phosphorylierungen, wurde nach phosphorylierten Stellen in den Tet-Enzymen gesucht. Anschließend wurden solche Phosphorylierungsstellen in Tet1 mutiert und das Interaktom der mutierten Tet-Proteine analysiert. Daraufhin wurden die Interaktome nach Enzymen durchsucht, welche in der Lage sind den Phosphorylierungsstatus von Proteinen zu verändern. Eine der auf diese Weise entdeckten Kinasen, Cdk11, zeigte einen inhibitorischen Effekt auf die Tet-Aktivität.

Summary

Epigenetics addresses the question of how different intracellular gene expression patterns are created and inherited on the basis of an identical DNA sequence. Currently in the focus of epigenetics are the Tet enzymes, which are capable of changing the methylation pattern of the DNA. This process is particularly interesting as the methylation state is important for epigenetic regulation. In detail, the Tet enzymes can generate the only recently discovered, modified bases 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxycytosine by successive oxidation of 5-methylcytosine. The distribution of these modified DNA bases varies especially during development and in different tissues as well as organs. The same holds true for the production of the three different Tet proteins (1-3), which were identified in vertebrates.

It is an open question why three different Tet enzymes are needed, as all of them are capable of the same catalytic function. In order to address this question, this thesis aimed to investigate the interactomes of the different Tet proteins. Therefore, a Tet-saturated co-immunoprecipitation workflow was developed that enables a direct and robust comparison of the different Tet interactomes. This affinity proteomics technique led to the elucidation of specific interaction profiles for Tet1 and Tet3 in mouse embryonic stem cells (mESCs) and neural progenitors (NPCs). Strikingly, almost no interaction partners could be detected for Tet2, whereas Tet1 and Tet3 were found to interact with numerous proteins involved in transcription and replication regulation. For Tet3, a specifically strong interaction with chromatin modifying complexes like NuRD, NuA4, PTW/PP1, FACT and SWI/SNF was discovered in mESCs, NPCs and mouse retina. This observation led to the conclusion that Tet3 might be active in genomic regions that require chromatin remodeling. In contrast, Tet1 might operate on euchromatin as significantly less members of chromatin modifying protein complexes were enriched for Tet1 in comparison to Tet3 (t-Test p-value = 0.0096). Indeed, fluorescence microscopy studies confirmed that Tet3 co-localizes with heterochromatin, contrary to Tet1. Hence, the difference between the individual Tet proteins could be their ability to access differently chromatinized regions of the genome.

Despite intensive research efforts, it is still unclear how the Tet enzymes are supplied with their cosubstrate α -ketoglutarate, which is essential for the oxidation reaction. Interestingly, many metabolic enzymes were found among the Tet3 interactors while studying the interactome of Tet3 in the mouse brain. Using co-immunoprecipitation, localization studies and proximity ligation assays, it could be shown that in the nucleus Tet3 indeed directly interacts with enzymes, which manufacture a number of α -ketoglutarate biosynthetic precursors. In addition, a direct interaction with glutamate

dehydrogenase (Glud1) in the cell nucleus was detected and confirmed. This enzyme converts the neurotransmitter glutamate directly into α -ketoglutarate, which establishes a citric acid cycle independent α -ketoglutarate supply.

Surprisingly, while the interaction of Glud1 with Tet3 stimulated the oxidation of mC to hmC, the metabolites oxaloacetate and isocitrate had an inhibitory effect on Tet3. Oxaloacetate and isocitrate are intermediates of the citric acid cycle and thus precursors for the biosynthesis of α -ketoglutarate. These metabolites seem to prevent the reactive Fe^{2+} -center from degrading DNA when Tet is inactive. This effect might be caused by the coordination of the Fe^{2+} -center by the metabolites.

The precise regulation of the Tet enzymes is not yet completely understood. In the course of this dissertation and in collaboration with Dr. Stylianos Michalakis' group, it was shown that the transcription repressor REST interacts with Tet3 and increases the Tet activity. REST seems to recruit Tet3 to specific loci of the DNA in order to hydroxymethylate mC and thus activate gene transcription in a context-specific manner.

However, not only interaction partners but also posttranslational modifications can influence enzyme activity. To study the effect of phosphorylation, the Tet enzymes were scanned for phosphorylated residues. Such phosphorylation sites were subsequently mutated in Tet1 and the interactome of these mutated Tet proteins was analyzed. Thereupon, the interactomes were searched for enzymes capable of changing the phosphorylation status of proteins. One of the detected kinases, Cdk11, indeed showed an inhibitory effect on the Tet activity.

1. Einleitung

Die DNA als Molekül des Lebens ist bereits seit über 60 Jahren bekannt.^[1] Ihre Bestandteile, die DNA-Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T), codieren die Erbinformation, die die Grundlage jedes Lebens ist. Wie aber ist es zu erklären, dass es eine Vielzahl unterschiedlichster Zelltypen in einem komplexen Organismus wie dem des Menschen gibt? Insbesondere im Hinblick darauf, dass sie die gleiche genetische Information tragen, sich jedoch in Form und Funktion stark unterscheiden? Und wie ist es möglich, dass sich eine Zelle differenziert oder sogar re-differenziert und einen anderen Zelltyp annimmt, wenn sich die DNA-Sequenz nicht ändert? Wann wird ein Gen abgelesen und wie wird es inaktiviert? Und wie werden diese Genaktivitätsmuster an Tochterzellen weitervererbt? Diesen und ähnlichen Fragen stellt sich das komplexe Feld der Epigenetik.

1.1. Epigenetik

Die Epigenetik befasst sich mit der Aufgabe, wie intrazellulär unterschiedliche Expressionsmuster auf Basis einer identischen DNA-Sequenz geschaffen und vererbt werden. Die zugrundeliegende Informationsquelle für diesen Vorgang muss also auf einem anderen Prinzip als der reinen Abfolge der Nukleotide basieren. Das sogenannte Epigenom manifestiert sich auf verschiedenen Ebenen. Auf Ebene der DNA über DNA-Modifikationen, auf RNA-Level beispielsweise über nicht-kodierende RNAs und RNA-Modifikationen, aber auch im Bereich der Proteine sowie des Chromatins.

1.1.1. Umstrukturierung des Chromatins

Bei näherer Betrachtung etwa ist Chromatin nicht nur für eine möglichst dichte Verpackung der DNA, sondern für viele grundlegende epigenetische Mechanismen verantwortlich. So kann die DNA frei und ablesbar im lockeren Euchromatin vorliegen oder im dicht gepackten, für die Transkriptionsmaschinerie unzugänglichen Heterochromatin.

Chromatin besteht aus DNA und DNA-bindenden Proteinen wie den Histonen. Abbildung 1.1A zeigt die Verpackung der DNA in Chromatinstrukturen.

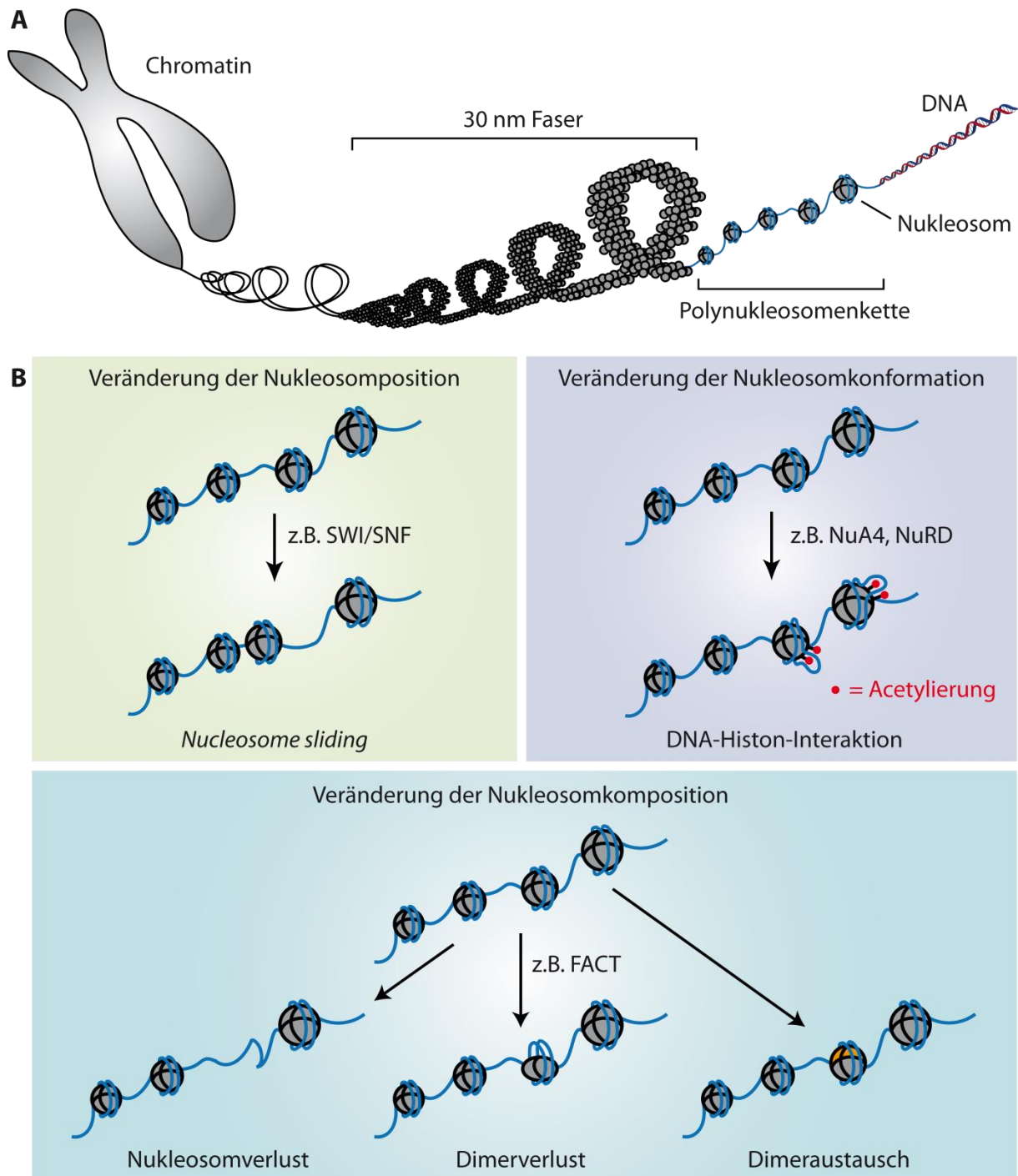


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Chromatinaufbaus. (A) Die DNA wird über die Bildung von Nukleosomen zu Chromosomstrukturen verpackt. (B) Nukleosome können über unterschiedliche Mechanismen zur Chromatinstrukturierung verändert werden. Veränderungen der Position, Konformation und Komposition der Nukleosomen können zur lokalen Freilegung der DNA und somit zur Transkription von bestimmten Genabschnitten führen.

Je zwei Untereinheiten der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden einen Kernhistonkomplex. Um solch einen Histonkomplex können 147 Basenpaare gewunden werden und ergeben so ein Nukleosom von 11 nm Durchmesser.^[2] Nukleosomen, die im Abstand von 10-90 Basenpaaren angeordnet sind,

kreieren eine Polynukleosomenkette. Diese DNA-Struktur ist hauptsächlich im Euchromatin zu finden, da sie räumlich Platz lässt für die Interaktion mit Faktoren, welche die Transkription von Genen ermöglichen.^[3] Die Polynukleosomenkette kann durch das Linker-Histon H1 weiter zu einer 30 nm Faser aufgewickelt werden.^[3-4] Auf diese Weise kondensiert, kann die DNA noch dichter gepackt und nicht mehr abgelesen werden (Heterochromatin).^[3]

Die beschriebenen verschiedenen Strukturen und ihre Zusammensetzung geben somit viele Möglichkeiten zur epigenetischen Regulation. So können, wie in Abbildung 1.1B illustriert, Nukleosome beim sogenannten *Nucleosome sliding* an der DNA entlang fahren, sodass unterschiedliche Bereiche der Sequenz freigelegt werden^[5-6]. Ein Beispiel eines chromatinverändernden Komplexes, der auf diesem Prinzip beruht, ist der SWI/SNF-Komplex.^[7-9] Eine weitere epigenetische Kontrollmöglichkeit bietet die variable Zusammensetzung der Histone im Histonkomplex. Zum Beispiel kann die Histonvariante H2A.Z das kanonische Histon H2A an Promoterregionen ersetzen, um Gene zu aktivieren.^[10-13] Histone können auch komplett entfernt werden, um die Transkription zu ermöglichen. So ist der FACT-Komplex in der Lage, das H2A/H2B-Dimer reversibel aus dem Histonkomplex zu lösen, sodass die RNA Polymerase II unbehindert DNA transkribieren kann.^[14-15]

Doch nicht nur solche nicht-kovalenten Mechanismen bringen Variation in das Chromatin, sondern auch kovalente Veränderungen mittels Histonmodifikation. Histone interagieren aufgrund ihres hohen Anteils basischer Aminosäuren mit dem negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA.^[16] Des Weiteren besitzen sie Aminosäureketten, die aus den Nukleosomen herausragen und für die weitere Verpackung der DNA benötigt werden.^[3] Diese Aminosäuren können posttranslational modifiziert werden, zum Beispiel durch Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung oder Sumoylierung. Werden Lysine beispielsweise durch Histon-Acetyltransferase-Komplexe wie den NuA4-Komplex acetyliert^[17], wird ihre vormals positive Ladung in eine negative umgekehrt, wodurch die Interaktion der Histone mit der negativ-geladenen DNA abgeschwächt wird. Solche Modifikationen modulieren allerdings nicht nur die Stärke der DNA-Histon-Interaktion und dadurch die Chromatinkondensierung, sondern bilden auch den sogenannten „Histon-Code“. Dieser Code wird von Proteinen abgelesen, die an bestimmte Histonmodifikationen binden oder durch diese eben nicht binden können. Beispielsweise verhindert die Methylierung von Lysin 4 am Histon H3, die Bindung des NuRD-Komplexes.^[18] Dieser Proteinkomplex ist besonders interessant, da er die beiden grundlegenden Mechanismen der Chromatinveränderung vereint. So besitzt der NuRD-Komplex gleichzeitig eine Histon-Deacetylase-Aktivität (kovalenter Mechanismus) und von

Adenosintriphosphat (ATP) abhängige Chromatinstrukturierungs-Aktivität (nicht-kovalenter Mechanismus).^[19]

Da diese Mechanismen reversibel sind und miteinander interagieren, entsteht eine enorme Plastizität der Genexpression.

1.1.2. DNA-Methylierung

Nicht nur Histone können kovalent modifiziert (z.B. methyliert) vorliegen, sondern auch die DNA. Die Proteinfamilie der DNA-Methyltransferasen (Dnmt) ist in der Lage, eine Methylgruppe von einem Donor (S-Adenosylmethionin, kurz SAM) auf einen Akzeptor, in diesem Fall Cytosin, zu übertragen.^[20-21] Das entstandene 5-Methylcytosin^[22-23], auch mC genannt, ist eine epigenetische Modifikation. So konnte mC in Zusammenhang mit der Genexpressionsregulation gebracht werden. Beispielsweise unterdrückt mC die Genexpression in Abläufen wie der Inaktivierung des X-Chromosoms, der Embryonalentwicklung, dem genomischen Imprinting sowie der Erhaltung der Chromosomenstabilität.^[24] Solch eine Regulation der Genexpression erfolgt über die Methylierung von CpG-Dinukleotiden in Promotorregionen. Promotoren aktiv exprimierter Gene liegen meist hypomethyliert vor, enthalten also nur wenige methylierte CpG-Dinukleotide.^[25-26] Eine vermehrte Methylierung von CpG-Dinukleotiden macht die Promotoren hingegen für Transkriptionsfaktoren unzugänglich.^[27-30, 24] Dies führt zu einer dauerhaften und sogar vererbaren Inaktivierung des Gens.^[25-26] Folglich spielt mC bei der dauerhaften Fixierung des Transkriptionszustands von Genen eine große Rolle.

Zwischen 4-6% der Cytidine von somatischen Säugetierzellen liegen methyliert vor.^[31-33] Diese werden von drei katalytisch aktiven DnmTs (Dnmt1, 3a und 3b) produziert.^[21, 34] Dnmt3a und Dnmt3b methylieren Cytosine *de novo*, wohingegen Dnmt1 mC-Muster während der Zellteilung konserviert und somit mC zu einer vererbaren, epigenetischen Modifikation macht.^[21, 34] Wird eines dieser Enzyme ausgeschaltet, ist die Wirkung auf Mäuse in der Entwicklung lethal.^[34-36] Demzufolge ist die DNA-Methylierung von großer Bedeutung für die vertebrale Entwicklung.

Dass die DNA-Methylierung als epigenetischer Prozess während der Entwicklung wichtig ist, zeigt auch die fast komplette globale Demethylierung des Genoms zum Zeitpunkt der Differenzierung der Zygote zur Blastozyste. Diese dient dem Zweck, den pluripotenten Zustand des Embryos herzustellen.^[37] Später, zur Zeit der Implantation, erfolgt dann eine programmierte *de novo* Methylierung der DNA.^[38, 37, 39-45]

Während dieser Differenzierungsprozesse sind die dynamischen und hochkontrollierten DNA- und Chromatin-Modifizierungen auf komplexe Weise verknüpft.^[28, 24] Beispielsweise erfolgt die ortsspezifische *de novo* Methylierung durch die Rekrutierung von Dnmt3a und Dnmt3b über den Histon-Code. Andersherum können Methyl-CpG-bindende Proteine wie MeCP2 und Mbd-Proteine an die modifizierte DNA binden und Histondeacetylasen rekrutieren.^[46] Dementsprechend wurde zum Beispiel auch der Chromatinstrukturierungs- und Histondeacetylase-Komplex NuRD als mC-Interaktor identifiziert, der die Transkription inhibiert.^[47-48, 19, 49] Das Methylierungsmuster stellt also vermutlich auch eine Vorlage für die Modifizierung von Histonen dar.^[50-52] Durch die Rekrutierung und Aktivität dieser Enzyme, wird das Chromatin in der Umgebung von methylierten Bereichen dichter gepackt und damit die Transkription verhindert.^[53-56] Dieser bidirektionale „cross talk“ zwischen DNA- und Histonmodifikationen moduliert somit die Gentranskription. Die DNA-Methylierung scheint dabei für die anhaltende Inaktivierung von Genen verantwortlich zu sein, da beispielsweise die X-Chromosom-Inaktivierung oder das Ausschalten der Pluripotenzgene während der Entwicklung auf methylierte Cytosine zurückzuführen ist.^[27-28]

1.1.3. Modifizierte Cytosinbasen

Die Methylierung von Cytosin ist allerdings nicht die einzige Modifikation dieser DNA-Base. In den letzten Jahren wurden immer mehr modifizierte Cytosinbasen entdeckt. So hat sich eine Oxidationskette herausgestellt, die mit dem bereits beschriebenen mC beginnt und über 5-Hydroxymethylcytosin (kurz hmC) und 5-Formylcytosin (fC) zum 5-Carboxycytosin (caC) verläuft. Diese Oxidationsreaktionen werden durch die Tet-Dioxygenasen katalysiert, auf die später näher eingegangen wird.^[57-60] Die aus der Oxidation von mC resultierenden Cytosinprodukte sind in Abbildung 1.2 dargestellt.

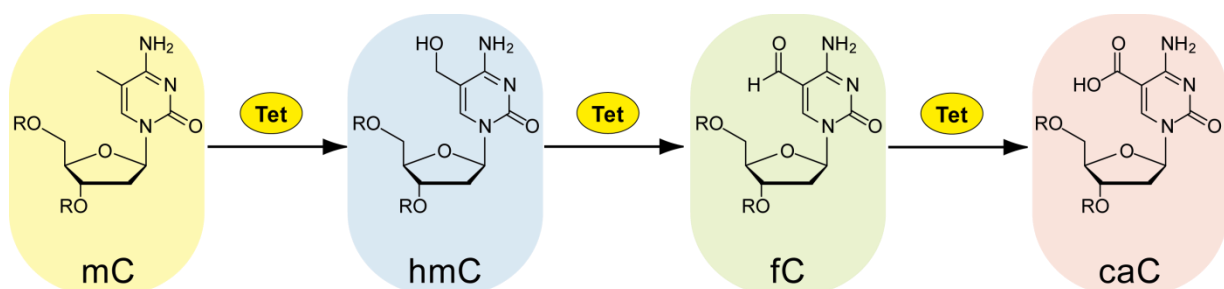


Abbildung 1.2: 5-Methylcytosin (mC) kann durch die Enzyme Tet1-3 zu 5-Hydroxymethylcytosin (hmC), 5-Formylcytosin (fC) und 5-Carboxycytosin (caC) oxidiert werden.

hmC wurde als Erste dieser neuen Cytosinmodifikationen entdeckt^[59-62] und gemeinhin als die „sechste Base“ bezeichnet.^[63] Diese Base wurde mit einem Gehalt von 0.6% pro G in Purkinje-Neuronen von Mäusen und 0.15% pro G in mESCs gefunden.^[59-60] Diese hmC-Level steigen mit zunehmendem Alter bis sie ein konstantes Niveau in ausgewachsenen Organismen annehmen.^[64-76] Interessant ist dabei, dass die hmC-Werte in verschiedenen Geweben stark variieren (0.03-0.7% pro G), wohingegen mC-Level eher gleich bleiben (im Durchschnitt $4.3 \pm 0.2\%$ pro G).^[32] Die höchsten hmC-Werte liefert das zentrale Nervensystem, wobei auch hier die Verteilung in den verschiedenen Gehirnnarealen Unterschiede zeigt (0.3-0.7% pro G).^[32, 59, 77, 63] Im Vergleich zu Mäusegeweben, weist das menschliche Gehirn sogar noch höhere hmC-Level auf. Hier liegt der höchste hmC-Gehalt bei 1.17% pro G im Cortex und der niedrigste bei 0.7% pro G in der cerebralen weißen Substanz.^[78, 74] Diese, in Abbildung 1.3 verdeutlichte, starke Variabilität und Abundanz an hmC im Gehirn könnte folglich mit zelltyp-spezifischer Transkriptionskontrolle und neuronaler Funktion zusammenhängen.^[32, 71, 63] Überdies deuten Studien daraufhin, dass die hmC-Level durch neurale Aktivität dynamisch reguliert werden.^[79-82]

Dass hmC in die Genregulation involviert ist, zeigt die Anreicherung dieser Base in Transkriptionsstartpunkten und Genkörpern und Promotoren.^[83-84, 77, 85-87, 72, 88-90] Die Existenz von hmC in intragenischen Regionen hat dabei stets eine positive Korrelation zur Gentranskription, während eine Anreicherung von hmC in Transkriptionsstartpunkten und Promotoren negativ mit der Transkription korreliert.^[91, 84, 68, 92, 77, 93-94, 72-73, 88-89, 95] Da man fast keine Reversion zu C neben der Oxidation von mC finden konnte^[68] und eine Vererbung mit Hilfe von Dnmt3a/3b an Tochterzellen möglich ist^[96], kann hmC als stabiler epigenetischer Marker bezeichnet werden.^[97] Somit spielt auch hmC vermutlich eine wesentliche Rolle in der epigenetischen Regulation von Genexpression und Zellentwicklung. Außerdem könnte hmC eine Vorstufe in der DNA-Demethylierung darstellen, die zur Reaktivierung der Gene führt, die durch die Methylierung inaktiviert waren.^[63, 98]

Da die hmC-Level bei zahlreichen Krebsarten im Vergleich zu gesundem Gewebe deutlich reduziert sind^[78, 99-100], könnte hmC folglich als diagnostischer Biomarker für Krebserkrankungen dienen.^[101-107, 99, 108-110] Doch auch in anderen Krankheitsverläufen spielt hmC eine wesentliche Rolle. Zum Beispiel ist der hmC-Interaktor MeCP2 ein zentrales Protein für die Entwicklung und Funktion des Gehirns. Ist dieses Protein mutiert, kommt es zu einer neuronalen Entwicklungsstörung, dem Rett-Syndrom.^[111] Solch eine Mutation hat zur Folge, dass MeCP2 seine Affinität für hmC verliert, wohingegen die Bindungsaffinität zu mC bestehen bleibt.^[93] Die Regulation der mC- und hmC-Level scheint daher von großer Bedeutung für die Zellintegrität zu sein. Zudem kann aus der Veränderung interagierender Proteine ein Verlust der epigenetischen Kontrolle und somit eine gestörte Zellentwicklung folgen.

Wie wichtig hmC für die Stabilität des Genoms ist, zeigt auch eine Studie^[112], die hmC in Bereichen von DNA-Schäden und deren Reparatur entdeckt hat. Dort colokalisiert hmC mit den Proteinen 53BP1 und γ H2AX, welche in die Antwort auf DNA-Schäden involviert sind.^[112] Zu weiteren Interaktoren von hmC zählen außerdem die Glykosylase Neil1 und die E3 Ubiquitin-Protein-Ligase Uhrf2 in NPCs.^[48] In mESCs und adultem Mäusegehirn konnten der Transkriptionsregulator Thap11/Ronin, sowie der in DNA-Replikation involvierte RFC-Proteinkomplex detektiert werden.^[113-114, 48, 115]

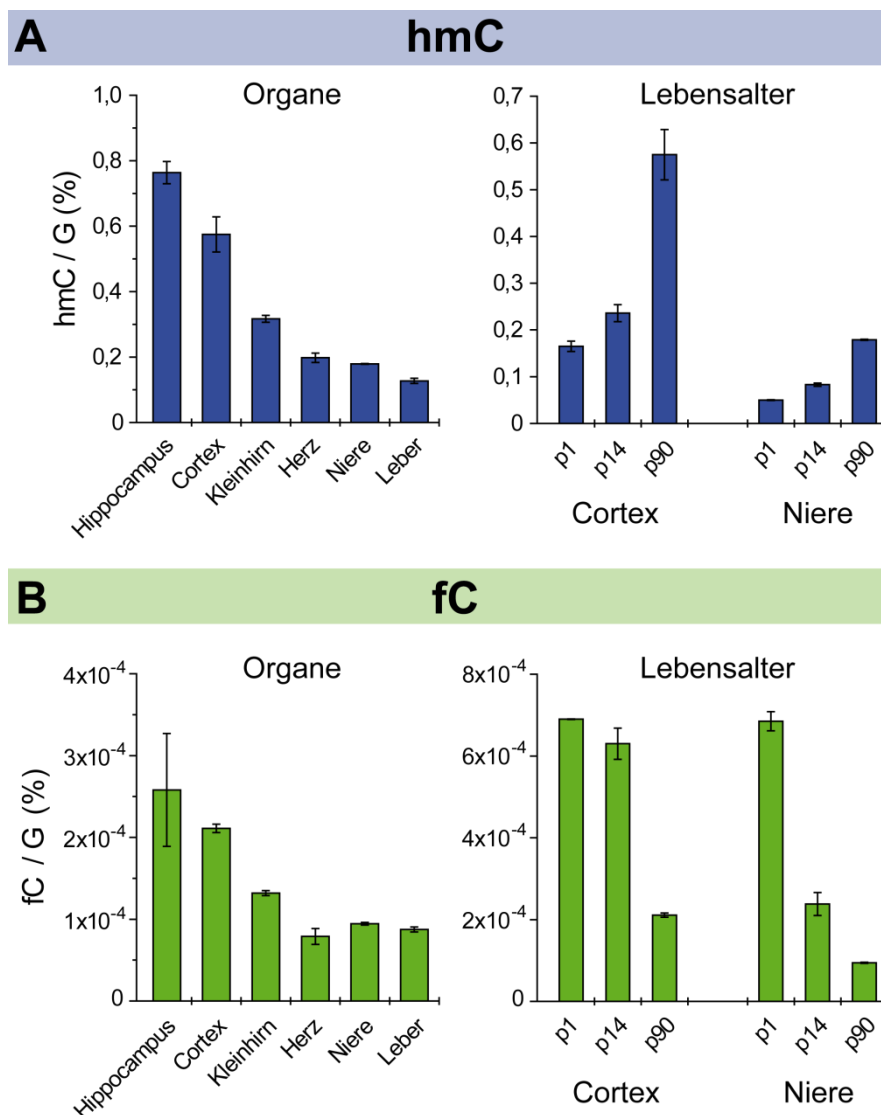


Abbildung 1.3: Verteilung der Cytosinderivate 5-Hydroxymethylcytosin (hmC) (A) und 5-Formylcytosin (fC) (B) in Organen^[116] und mit zunehmendem Alter^[74] der Maus. Die Konzentrationen der modifizierten Cytosinbasen sind in Relation zu hundert Guaninbasen angegeben, da die Anzahl an Guaninbasen gleich der Gesamtzahl aller Cytosinbasen (modifiziert und unmodifiziert) ist. p1 = postnataler Tag 1, p14 = postnataler Tag 14, p90 = postnataler Tag 90 (adaptiert aus^[117])

Das zweite Oxidationsprodukt nach hmC, ist das fC, welches erst kürzlich in der genomischen DNA von mESCs gefunden wurde.^[118] Eine Auswahl der fC-Level in verschiedenen Organen und im Altersverlauf der Maus ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Kurz nach der Entdeckung von fC, detektierte man auch das letzte Produkt dieser Oxidationskette, das caC.^[57-58] Diese beiden Cytosinderivate sind allerdings seltener als mC und hmC. Das Level von fC zu hmC beträgt in etwa 1:10 und das von caC zu hmC lediglich 1:100.^[58, 116]

Obwohl die Werte an fC und caC gering sind, scheinen sie eine große Rolle in der epigenetischen Regulation und aktiven Demethylierung zu spielen. Beispielsweise ist fC insbesondere in der Nähe von Transkriptionsstartpunkten und Histon H3 Lysin 4 (H3K4)-trimethylierten Histonen angereichert. Außerdem bindet die RNA-Polymerase II Sequenzen, in denen fC angereichert ist.^[119] Es konnte außerdem gezeigt werden, dass fC und caC die RNA-Polymerase II in Genkörpern hemmen.^[120-121] Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass fC mit der Gentranskription verbunden ist. Auch caC reguliert möglicherweise die Transkription, da caC besonders im Euchromatin von Follikelzellen identifiziert wurde.^[122] Beide Cytosinderivate wurden außerdem in erhöhter lokaler Konzentration in proximalen Promotoren gefunden.^[123, 119, 124]

Weitere Studien zeigen, dass fC und caC in Mäuseembryos vor der Implantation entstehen und der Gehalt während der Replikation abnimmt.^[125] Aktive *Enhancer*-Bereiche und funktionell wichtige genomische Regionen besitzen besonders hohe Level an fC.^[126-127] Eine transiente Anhäufung von fC und caC findet auch in zelltypspezifischen Promotoren statt, wenn NPCs zu Gliazellen und Neuronen differenzieren.^[128] Zudem geht einer Hochregulierung der Expression von metabolischen und für die Entwicklung kritischen Genen eine fC-Produktion in den Promotoren voraus.^[127] Da sich die dynamischen Level an fC von denen an hmC während der Entwicklung unterscheiden und fC über längere Zeit dauerhaft in der DNA bleibt, kann fC als stabile DNA-Modifikation gesehen werden.^[129-130] Dass fC und caC auch epigenetische Funktionen haben, lässt ihre Anhäufung insbesondere in intragenischen Regionen und Sequenzen mit regulatorischer Funktion vermuten.^[126, 45]

Diese Schlussfolgerung legen auch die Interaktoren von fC und caC nahe, unter denen nicht nur DNA-Reparaturenzyme zu finden sind, sondern auch transkriptionelle Regulatoren.^[47-48] So wurden beispielsweise Forkhead-Box-Proteine (FOX-Proteine) als fC-Interaktoren entdeckt. Diese sind DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, welche die lokale Struktur des Chromatins verändern und Genexpression regulieren können.^[131-132] Zu beachten ist auch, dass fC zum Teil ähnliche lokale Konzentrationen zu mC oder hmC aufweist.^[133] Zudem ist umstritten, ob fC in der Lage ist, die Struktur der DNA zu verändern und so die Transkription zu beeinträchtigen.^[134-135] Für caC wurde insbesondere ein Zusammenhang mit MAX, dem Bindungspartner des onkogenen

Transkriptionsfaktors MYC, hergestellt. Diese Proteine regulieren ebenfalls die Genexpression und stellen so eine Möglichkeit dar, wie MAX als epigenetischer Sensor von modifizierten Cytosinbasen das MAX-MYC-Transkriptionsnetzwerk beeinflusst.^[136]

Zusammenfassend stellen die soeben beschriebenen modifizierten Cytosinbasen durch ihre Variabilität und ihren Einfluss auf die Gentranskription folglich potentielle epigenetische Marker dar.^[129, 97] Interessant ist auch, dass die Interaktome der einzelnen Cytosinderivate in verschiedenen Zelltypen sehr unterschiedlich sind und damit eine große Dynamik zeigen.^[48] Welche Rolle diese Cytosinmodifikationen bei der Demethylierung von DNA spielen, wird im nächsten Kapitel näher erläutert.

1.1.4. DNA-Demethylierung

Soll ein Gen wieder aktiviert werden, muss die Methylgruppe des mCs wieder entfernt werden, sodass ein für die Transkription zugängliches Cytosin entsteht. Solche Demethylierungsvorgänge finden beispielsweise in Neuronen^[137-141, 98, 142] oder während der embryonalen Entwicklung statt, um Zellen zu reprogrammieren.^[38, 37, 39-40, 143-144, 41-43, 145, 44] Aus diesem Grund ist das Wissen über diese Abläufe von großem Wert, um Krankheiten aufgrund aberranter Genexpression besser zu verstehen oder ausdifferenzierte Zellen gezielt zu reprogrammieren. Wie diese Demethylierungsprozesse ablaufen, ist Gegenstand aktueller Forschung, da mehrere Varianten möglich erscheinen. Allerdings spielen bei den verschiedenen Szenarien die eben beschriebenen oxidierten Methylcytosinderivate eine maßgebliche Rolle.^[146-153, 45]

Allgemein kann DNA auf zwei verschiedene Arten demethyliert werden, aktiv oder passiv. Bei der passiven Demethylierung werden mC oder die oxidierten Cytosinderivate verdünnt, indem der während der DNA-Replikation gebildete Gegenstrang nicht modifiziert wird.^[154-155, 148] Die aktive Demethylierung basiert auf einer nicht-replikationsgekoppelten Transformation von mC zu C durch bestimmte Enzyme.^[98] Dies kann entweder durch das Austauschen des kompletten Nukleotids oder mittels Abspaltung der (substituierten) Methylgruppe geschehen.^[45, 98] In dem einen Fall wird also das ursprüngliche Cytosin behalten, während in dem anderen Szenario durch das Entfernen der gesamten Base mittels einer Glykosylase eine abasische Stelle entsteht, die via Basenexzisionsreparatur (BER) mit einem neuen Cytosin aufgefüllt wird.^[156-158]

1.1.4.1. Aktiv-passive Demethylierung

Es gibt allerdings auch Studien, die eine Kopplung von aktiven und passiven Prozessen zur Demethylierung vorschlagen.^[159, 148] So konnte gezeigt werden, dass im väterlichen Pronukleus mC enzymatisch oxidiert wird (aktiv)^[160, 41] und in der darauffolgenden Zellteilung die oxidierten Methylcytosinderivate verdünnt werden (passiv).^[159] Diese replikationsgekoppelte Verdünnung wird vermutlich durch Dnmt1 verursacht, da dieses Enzym hemimethylierte gegenüber hemihydroxymethylierten Positionen in der DNA bevorzugt.^[161] Auf diese Weise kann die DNA durch aktive Modifizierung und anschließende passive Verdünnung demethyliert werden.^[148]

1.1.4.2. BER-vermittelte aktive DNA-Demethylierung

Wie in Abbildung 1.4 dargestellt, könnte die BER-vermittelte aktive DNA-Demethylierung über verschiedene Wege verlaufen. So könnte die Thymin-DNA-Glykosylase (Tdg) aus dem DNA-Strang Cytosinderivate herausschneiden^[162] oder sogar Uracilderivate, die durch die Umwandlung von mC in Thymin über eine Desaminierung entstehen könnten.^[147, 45] Ähnlich zur Reparatur beschädigter DNA-Basen, würde nach der N-glykosidischen Spaltung der Zuckerrest durch eine Endonuklease entfernt und die fehlende Base von einer DNA-Polymerase ersetzt werden.^[156-158] So konnte gezeigt werden, dass Tdg fC und caC entfernt und die resultierende abasische Stelle durch Insertion eines unmodifizierten Cytosins repariert werden kann.^[57, 163] Beispielsweise akkumulieren in zelltypspezifischen Promotoren während der Differenzierung von NPCs zu Gliazellen und Neuronen zeitweise fC und caC. In NPCs liegen diese Promotoren stark methyliert und deren Gene somit inaktiv vor. Durch die Oxidation von mC zu fC und caC während der Differenzierung, können die methylierten Regionen durch die Exzision via Tdg mit unmethyliertem Cytosin ersetzt werden und ermöglichen so die Transkription der zelltypspezifischen Gene.^[124, 128]

1.1.4.3. Desaminase-vermittelte aktive Demethylierung

Des Weiteren könnte die aktive Demethylierung durch eine Desaminierung stattfinden^[148, 164, 45], vermutlich über die AID/APOBEC-Proteinfamilie^[165-166] (Abbildung 1.4).

1.1.4.4. Enzymatische Entfernung der oxidierten Methylgruppe

Ein weiterer postulierter Weg der aktiven Demethylierung verläuft über die enzymatische Entfernung der oxidierten Methylgruppe. Abhängig von dem zu eliminierenden Cytosinderivats, könnte es sich hierbei um eine Dehydroxymethylierung von hmC, Deformylierung von fC oder Decarboxylierung von caC handeln.^[167-168] Dieser Prozess wäre deshalb besonders vorteilhaft, weil kein DNA-Strangbruch stattfinden würde und somit die genomische Stabilität gewährleistet wäre. Ferner ist die Reaktion thermodynamisch vorteilhaft.^[168]

Einen Überblick über die postulierten, aktiven DNA-Demethylierungswege bietet Abbildung 1.4.

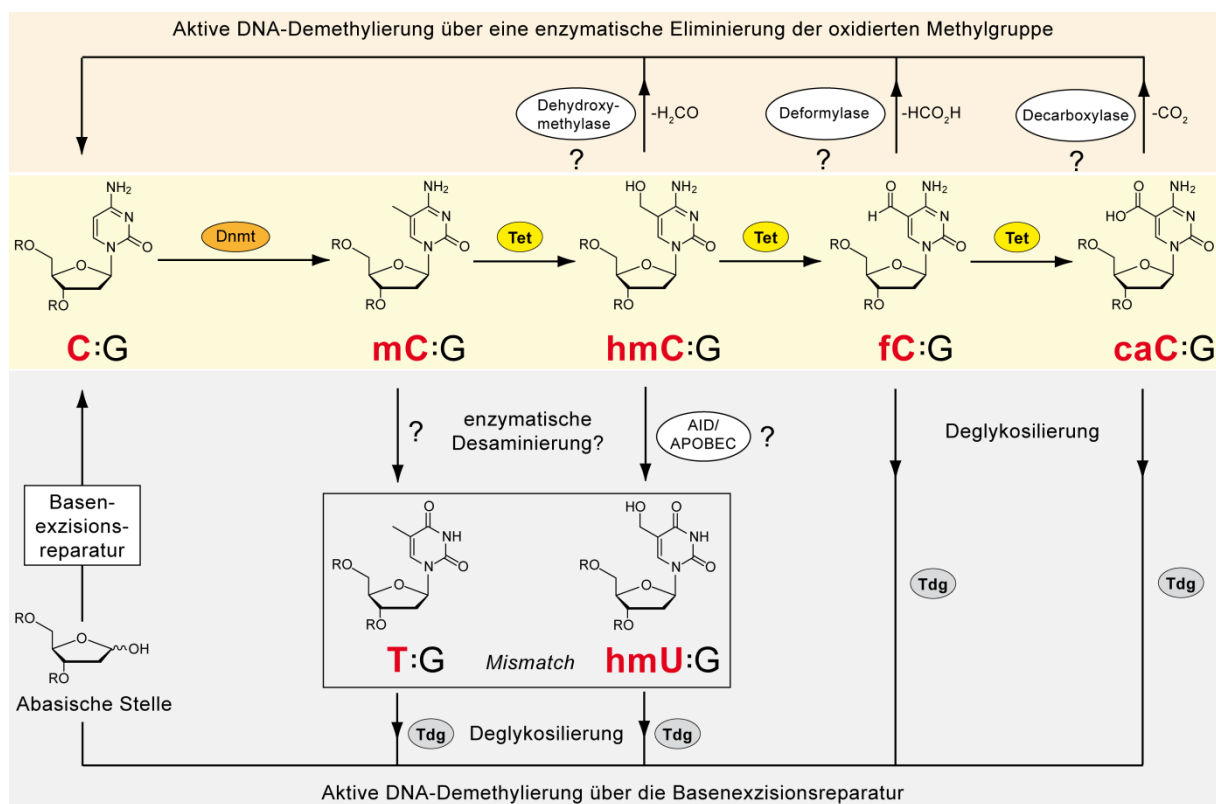


Abbildung 1.4: Zusammenfassung der postulierten Wege zur aktiven Demethylierung der DNA. Die modifizierten Cytosinbasen können über Basenexzisionsreparatur oder eine Entfernung der oxidierten Methylgruppe in Cytosin umgewandelt werden.

Zusammenfassend gibt es also viele mögliche Szenarien der DNA-Demethylierung, in denen oxidierte Cytosinderivate als Intermediate eine wichtige Rolle spielen.^[146-152, 124, 153, 45] Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang auch der Metabolismus und die Bildung dieser Basen. Im folgenden Kapitel wird daher näher beschrieben, wie die oxidierten Cytosinderivate generiert werden.

1.2. Tet-Enzyme

Die soeben beschriebenen modifizierten Cytosinbasen $\text{hmC}^{[60]}$, $\text{fC}^{[58, 118]}$ und $\text{caC}^{[57-58]}$ werden durch die Proteinfamilie der Tet-Enzyme gebildet.^[169, 146, 170, 148, 151, 60, 171] Zudem wurde erst kürzlich entdeckt, dass die Tet-Proteine auch Thymin oxidieren und so die DNA-Base 5-Hydroxymethyluracil (hmU) generieren können.^[116] Die durch die Tet-Familie katalysierten Reaktionen sind in Abbildung 1.5 zusammengefasst. Diese Enzyme spielen folglich eine wesentliche Rolle bei der epigenetischen Genregulation.^[172-173, 45] So sind die Tet-Proteine auch in der Regulation der genetischen Prägung involviert, da sie vermutlich die DNA-Methylierungsmuster in genomisch geprägten Regionen von mESCs durch Demethylierung beeinflussen.^[174]

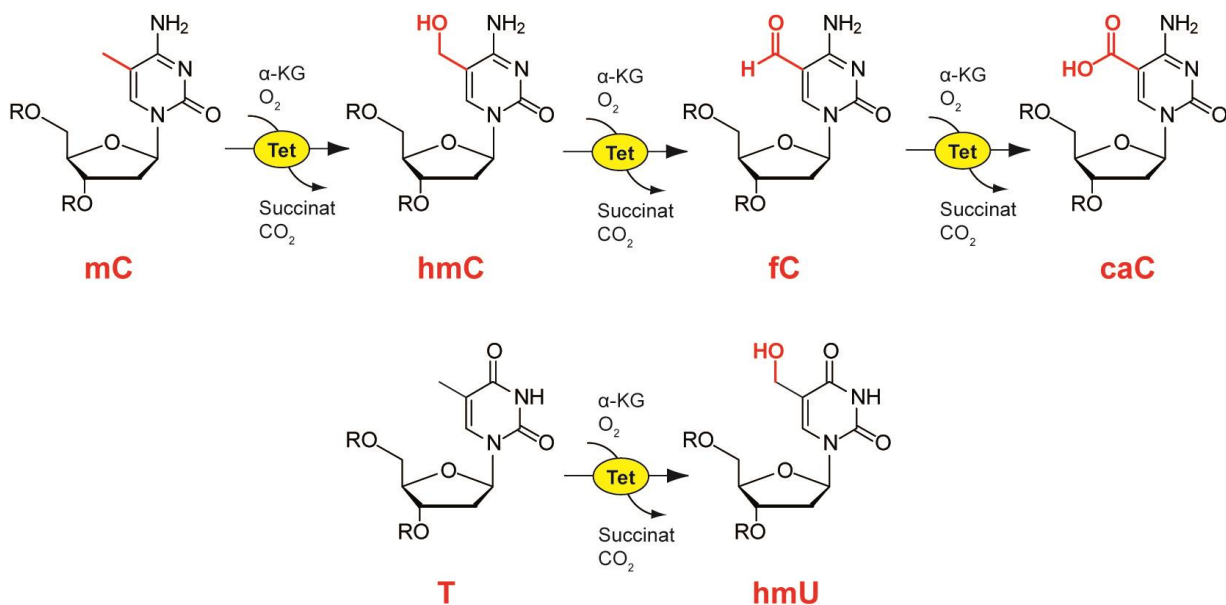


Abbildung 1.5: Tet-Enzyme katalysieren die Oxidation von 5-Methylcytosin (mC) zu 5-Hydroxymethylcytosin (hmC), 5-Formylcytosin (fC) und 5-Carboxycytosin (caC), sowie von Thymin (T) zu 5-Hydroxymethyluracil (hmU). Bei der Oxidationsreaktion werden α-Ketoglutarat (α-KG) und Sauerstoff (O₂) zu Succinat und Kohlenstoffdioxid (CO₂) umgewandelt.

Tet steht hierbei für *ten-eleven translocation* und gehört zur Klasse der Fe(II)- und α-Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen.^[175] Der ungewöhnliche Name begründet sich aus der Entdeckung des TET1-Proteins als Fusionspartner der H3K4-Methyltransferase MLL, noch bevor dessen Funktion aufgeklärt wurde. Man fand heraus, dass das *Tet1*-Gen in Leukämie-Patienten von Chromosom 10 zu Chromosom 11 translozierte und so kam die Bezeichnung *ten-eleven translocation* (zu Deutsch zehne-elf Translokation) zustande.^[176-177]

Alle vielzelligen Organismen besitzen Tet-Enzyme.^[170] Durch die Verdreifachung des *Tet*-Gens entstanden in Säugetieren drei paraloge Tet-Proteine: Tet1, Tet2 und Tet3.^[178, 170, 176] Diese Enzyme

spielen nicht nur in der Embryonalentwicklung^[179, 171], sondern auch in der Erhaltung der Pluripotenz von Stammzellen eine maßgebliche Rolle.^[180] Besonders interessant dabei ist, dass alle drei Enzyme die gleiche Oxidationsreaktion katalysieren.^[151]

1.2.1. Katalytische Aktivität der Tet-Enzyme

Der Oxidationsmechanismus der Tet-Enzyme ist noch nicht vollständig entschlüsselt, jedoch geht man von einer den Fe(II)- und α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen ähnlichen Reaktion aus.^[181, 146, 182, 175, 180, 183, 177, 184-190, 171] Auch gibt es widersprüchliche Beobachtungen, ob die Tet-Proteine ihre Substrate für die schrittweise Oxidation jedes Mal neu binden (distributiv)^[191-192] oder ob sie das Substrat zu Beginn binden und für die weitere Oxidation in ihrer katalytischen Tasche behalten (iterativ)^[193]. Eine weitere Frage ist, ob die Tet-Enzyme Präferenzen für die einzelnen Cytosinderivate haben. Hu und Kollegen konnten beispielsweise herausfinden, dass Tet-Proteine mC gegenüber hmC oder fC als Substrat präferieren.^[194] Auch konnte gezeigt werden, dass durch die Mutation eines konservierten Threoninrestes (Thr1372) im aktiven Zentrum von TET2 die Oxidation zu hmC abläuft, die Reaktion zu fC und caC jedoch nahezu ausgeschlossen ist.^[195]

Wie das Substrat mC in der katalytischen Tasche des Tet-Enzyms sitzt, ist in Abbildung 1.6A verdeutlicht. Das Cosubstrat, hier N-Oxalylglycin (NOG) statt α -Ketoglutarat, wird durch den Argininrest (Arg1261) in unmittelbarer Nähe zu mC gehalten. Das für die katalytische Reaktion essentielle Eisenion ist in der abgebildeten Kristallstruktur nicht zu sehen, da es eine Ebene weiter vorne liegt. Diese Ebene ist im Folgenden in Abbildung 1.7B dargestellt.

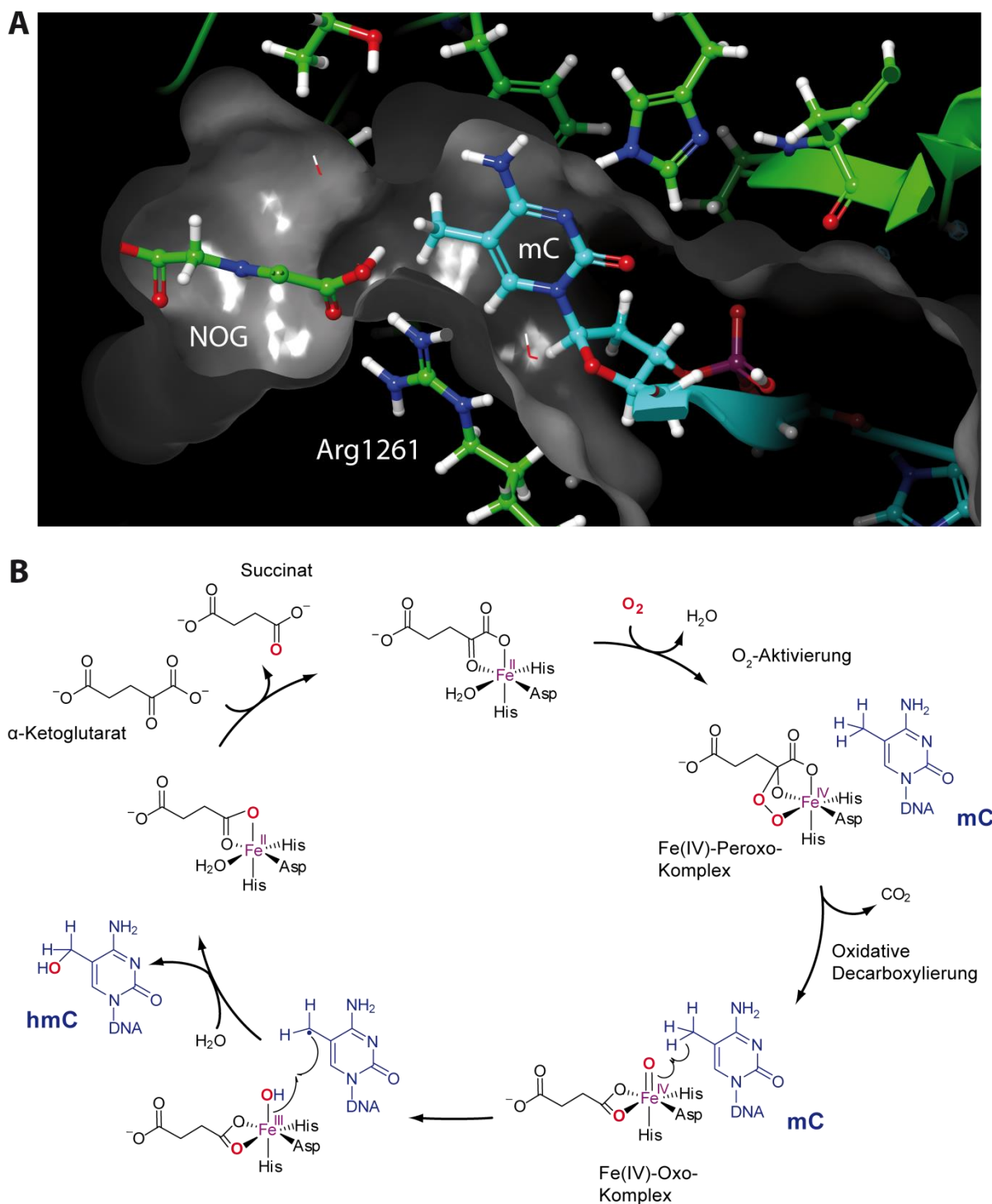


Abbildung 1.6: Tet-Proteine oxidieren Cytosinderivate wie 5-Methylcytosin (mC) mit Hilfe des Cosubstrats α -Ketoglutarat. (A) Das Cosubstrat (hier N-Oxalylglycin = NOG) wird durch den Argininrest (Arg1261) des Tet-Proteins in der katalytischen Tasche gehalten und in direkte Nähe zum Substrat mC gebracht (PDB ID: 4NM6). (B) Katalysezyklus der Tet-Enzyme am Beispiel der Oxidation von mC zu 5-Hydroxymethylcytosin (hmC). (adaptiert aus^[117])

Die in Abbildung 1.6B gezeigte Oxidationsreaktion verläuft über einen Ping-Pong-Mechanismus.^[196] Zu Beginn wird das Fe(II) im katalytischen Zentrum des Enzyms durch das Cosubstrat α -Ketoglutarat

und bimolekularem Sauerstoff zu Fe(IV) oxidiert. Es kommt zu einem Ligandenaustausch, wobei zwei Moleküle H₂O durch α -Ketoglutarat ersetzt werden, und zur Bindung des primären Substrats.^{[197, 125,}

^{41]} Durch die resultierende Schwächung der Bindung des axialen Wasserstoffmoleküls, kann O₂ binden und Fe(II) zu Fe(III) oxidiert werden.^[181, 175, 198, 42] Die weitere Oxidation von Fe(III) zum Fe(IV)-

Oxo-Intermediat und die oxidative Decarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinat werden als irreversibel und ratenbestimmend postuliert.^[181, 146, 182, 197, 175, 125, 180, 187, 199, 188-189, 171] Durch C-H-

Abstraktion oxidiert das entstandene Fe(IV)-Oxo-Intermediat anschließend das primäre Substrat.

Hierbei bildet sich intermediär ein Substrat-Radikal, welches durch eine Übertragung eines Hydroxy-Radikals mit dem als Zwischenstufe auftretenden Fe(III)-Hydroxo-Komplex reagiert. Am Ende der Reaktion ist das Fe(II)-Zentrum wieder hergestellt und das entstandene Produkt verlässt die katalytische Tasche. In Abbildung 1.6B ist dieses Produkt beispielsweise hmC. Analog dazu können auch fC, caC oder hmU gebildet werden. Schlussendlich endet der Katalysezyklus mit einem Ligandenaustausch, bei dem das produzierte Succinat durch α -Ketoglutarat ersetzt wird.^[183-184, 186, 190]

Interessant ist dabei, wie die Tet-Proteine an das α -Ketoglutarat für die Oxidationsreaktion gelangen. α -Ketoglutarat ist ein Zwischenprodukt des Citratzyklus, der in Mitochondrien abläuft. Dort wird α -Ketoglutarat aus Isocitrat durch die Isocitratdehydrogenase (Idh) hergestellt. Da die Tet-Enzyme im Zellkern aktiv sind, stellt sich die Frage, wie das α -Ketoglutarat aus den Mitochondrien in den Zellkern kommt.

1.2.2. Aufbau der Tet-Proteine

Da die Oxidationsreaktion bei den verschiedenen Tet-Enzymen die gleiche ist, haben alle Tet-Proteine eine ähnliche katalytische Domäne. Sie befindet sich am C-terminalen Ende der Enzyme und besteht aus einer doppelsträngigen β -Helix-Region (DSBH) und einem evolutionär konserviertem Cystein-reichen Abschnitt.^[200-203, 170, 60] Hierbei konnte durch eine Analyse der Kristallstruktur der katalytischen Domäne von TET2 gezeigt werden, dass sich die Cystein-reiche Region um den DSBH-Kern windet.^[203] Eine Fläche des oktaedrischen Eisen-Zentrums generiert in der DSBH-Region ein stark konserviertes Fe(II)-Bindungsmotiv mit der Sequenz His-X-Asp/Glu-X_N-His. Zwei Histidine sowie ein Aspartat komplexieren dabei das Fe(II)-Ion und ein konservierter Argininrest bindet das Cosubstrat α -Ketoglutarat über eine Salzbrücke (Abbildung 1.6A).^[200-203, 170] Stabilisiert werden die katalytische Domäne und die gebogene DNA-Struktur von drei Zn(II)-Zentren (Zinkfinger). Dies ermöglicht das für den Reaktionsmechanismus wichtige Herausdrehen des Substrats, zum Beispiel mC, aus der DNA mit Hilfe eines *flipping*-Mechanismus. Die verdrehte Base kann man deutlich in der

Kristallstruktur erkennen, welche in Abbildung 1.7A dargestellt ist. Durch diesen *flipping*-Mechanismus kann die Methylgruppe oder analog die Hydroxymethyl- oder Formylgruppe des Substrats in unmittelbare Nähe des Fe(II)-Zentrums in der katalytischen Tasche des Enzyms für die Oxidationsreaktion positioniert werden.^[201, 203] Das Substrat wird hierbei über zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten der Histidin- und Asparaginreste und der N3- und N4-Position des Substrats erkannt und gebunden.^[203]

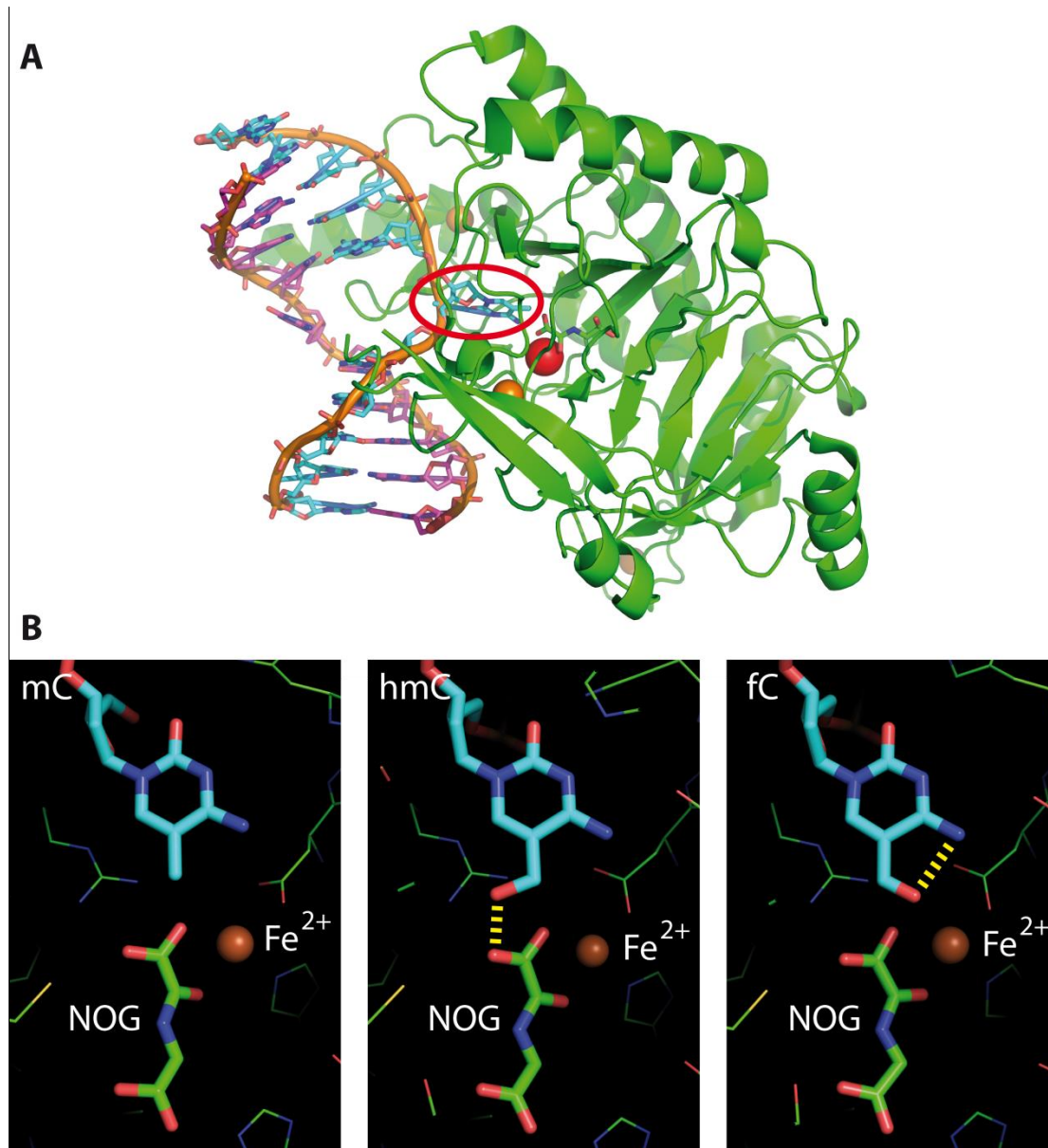


Abbildung 1.7: Die Kristallstruktur der katalytischen Domäne von Tet2 im Komplex mit DNA zeigt die Lokalisation des Substrats. (A) Die zu oxidierende Cytosinbase (rot markiert) wird aus der DNA und in die katalytische Tasche des Enzyms gedreht (PDB ID: 4NM6). (B) Die Substrate 5-Methylcytosin (mC), 5-Hydroxymethylcytosin (hmC) und 5-Formylcytosin (fC) nehmen ähnliche Konformationen im aktiven Zentrum des Tet-Enzyms ein (PDB ID: 4NM6, 5DEU, 5D9Y). N-Oxalylglycin (NOG) wurde in der Kristallstruktur als Analog von α -Ketoglutarat verwendet. Wasserstoffbrücken sind gelb markiert.

Abbildung 1.7B zeigt im Vergleich die Kristallstrukturen der katalytischen Tasche von Tet2 mit den gebundenen Substraten mC, hmC und fC. Zu sehen ist, dass die Pyrimidinbase bei allen Cytosinderivaten eine fast identische Konformation im aktiven Zentrum einnimmt. Nur die Hydroxylgruppe von hmC beziehungsweise die Carbonylgruppe von fC zeigen in entgegengesetzte Richtungen.^[194] Dies liegt an den unterschiedlichen Bindungen, welche die beiden modifizierten Cytosinbasen mit der katalytischen Tasche eingehen. Die Hydroxymethylgruppe von hmC bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carboxylat von NOG, einem Analog von α -Ketoglutarat. Dagegen formt die Formylgruppe von fC eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem N4 exozyklischen Stickstoff des Cytosins. Die eingezwängte Konformation von hmC und fC könnte die Wasserstoffabspaltung während der Oxidationsreaktion beeinträchtigen und so die katalytische Effizienz verringern. Dies könnte ein Grund für die beobachtete Substratpräferenz für mC im Gegensatz zu hmC oder fC sein.^[194]

Die Substraterkennung der Tet-Enzyme zeigt außerdem eine Präferenz für mCpG-Dinukleotide.^[201, 203] Neben dieser Präferenz wurden allerdings keine weiteren Sequenzspezifitäten zu benachbarten Basen identifiziert. Andere Dinukleotide wie mCpA, mCpT und mCpC oxidieren mit geringeren Reaktionsraten.^[203] Möglich ist überdies sogar eine Oxidation von mC zu hmC in RNA.^[204]

Neben der katalytischen Domäne haben Tet-Proteine auch eine variable Einfügung (Insert) in der DSBH-Region. Dieses Insert steht von der katalytischen Domäne ab^[201, 203] und ist in den verschiedenen Tet-Enzymen unterschiedlich groß.^[178, 170, 179] Außerdem ähnelt das Insert von Tet1 der RNA-Polymerase II C-terminalen Domäne (CTD) aus *Sacharomyces cerevisiae*.^[205]

Zusätzlich zu den eben besprochenen Domänen, die jedes der Tet-Proteine besitzt, gibt es noch eine CXXC-Domäne, die nur in Tet1 und Tet3 vorkommt. Abbildung 1.8 illustriert die Struktur der verschiedenen Tet-Enzyme mit und ohne CXXC-Domäne. Die CXXC-Domäne ist eine Zinkfinger-Domäne, welche in vielen Chromatin-assoziierten Proteinen ein DNA-Bindungsmotiv darstellt.^[170, 206, 176] Sie ist in den Tet-Proteinen N-terminal lokalisiert und fehlt in Tet2 komplett.^[200-201, 203] Das *Tet2*-Gen verlor evolutionär den CXXC-codierenden Abschnitt aus seiner Sequenz aufgrund einer chromosomalen Inversion.^[170] Der auf diese Weise verlorene Abschnitt verwandelte sich in ein eigenständiges Gen mit dem Namen *Idax* (oder *CXXC4*).^[178, 207] Interessant ist auch, dass es in höheren Säugetieren eine Splicingform von Tet3 gibt, der die CXXC-Domäne komplett fehlt.^[208]

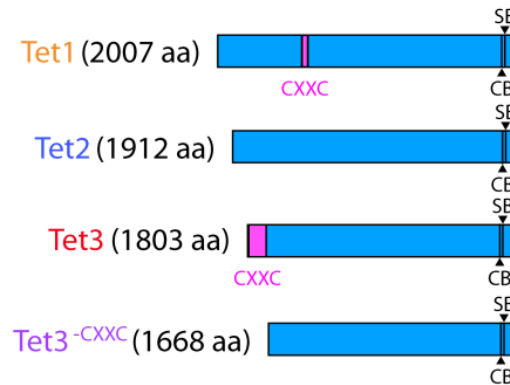


Abbildung 1.8: Schematische Repräsentation der unterschiedlichen Tet-Proteine. Tet1 ist das größte Tet-Enzym und besitzt eine CXXC-Domäne. Hingegen kann Tet3 mit CXXC-Domäne oder als N-terminal verkürzte Isoform ohne CXXC-Domäne (Tet3^{CXXC}) vorliegen. Aa = Aminosäuren; SB = Substratbindungsstelle; CB = Cosubstratbindungsstelle

Die CXXC-Domäne besteht aus etwa 60 Aminosäuren^[50, 47-48] und besitzt das konservierte Motiv CGXCXXC(X)_NC (X = beliebige Aminosäure) in zwei Kopien. Des Weiteren koordiniert sie ein Zn(II)-Ion.^[209] Da die CXXC-Domänen Chromatin-assoziiierter Proteine hauptsächlich unmethylierte CpG-Sequenzen binden, wurden die Tet-Proteine besonders in unmethylierten Regionen der DNA lokalisiert gefunden. Allerdings weisen die CXXC-Domänen der Tet-Proteine wohl eine breitere Sequenzselektivität auf.^[207, 88, 210] Beispielsweise scheint die CXXC-Domäne von Tet3 in der Lage zu sein nicht nur unmethylierte CpGs, sondern auch CpAs, CpCs und CpTs zu binden.^[211] Außerdem ist es möglich, dass die CXXC-Domäne von Tet1 sowohl unmethylierte als auch methylierte CpGs binden kann.^[212-213]

Dadurch, dass die Tet-Proteine mit Hilfe der CXXC-Domäne im Allgemeinen CpG-reiche Genpromotoren binden, wirken sie sich auf die Genexpression aus.^[88, 188] Diese Auswirkung kann sehr unterschiedlich ausfallen. Während Tet1 und Tet3 durch ihre Bindung an Promotorregionen die Genexpression in mESCs inhibieren^[88], wirkt Tet2 aktivierend auf Promotoren und somit die Transkription.^[214] Solche unterschiedlichen Effekte können durch das Zusammenspiel der Tet-Enzyme mit interagierenden Proteinen erklärt werden, die beispielsweise die Chromatinstruktur und damit die Ablesbarkeit der Gene verändern.^[181, 196, 215-216, 88] Die bisher bekannten Interaktionspartner und Charakteristika der verschiedenen Tet-Proteine werden im Folgenden näher analysiert.

1.2.3. Tet1

1.2.3.1. Struktur von Tet1

Wie soeben beschrieben besitzt Tet1 eine 42 Aminosäuren umfassende CXXC-Domäne an Position 567 – 608. Tet1 enthält insgesamt 2007 Aminosäuren und hat eine Größe von etwa 219 kDa. Damit ist Tet1 das größte Protein der Tet-Familie. An Position 1922 – 1924 erfolgt die Bindung mit α -Ketoglutarat, während die Substratbindung an Position 1928 – 1930 stattfindet (Abbildung 1.8) (UniProt Accession Number: Q3URK3).

Tet1 oxidiert mC in mESCs insbesondere an Transkriptionsstartpunkten und Promotoren, sowie in intragenischen Regionen.^[92] Ist hmC an Transkriptionsstartpunkten oder Promotoren angehäuft, ist die Transkription negativ beeinflusst, wohingegen eine Anreicherung von hmC in Genkörpern positiv mit der Gentranskription korreliert.^[91, 68, 92, 94]

Ist Tet1 ausgeschaltet (Tet1^{-/-}), sind die *Knockout*-Mäuse lebensfähig, fruchtbar und größtenteils normal.^[217] Jedoch zeigen sie Gedächtnis- und Lernschwierigkeiten.^[218] Dies liegt daran, dass die Transkription von Gedächtnis-assoziierten Genen durch Tet1 aufrechterhalten wird, indem Tet1 eine Hypermethylierung der Promotoren verhindert.^[219, 218] Allgemein weisen Studien auch vermehrt darauf hin, dass die Tet-Proteine durch lokusspezifische Demethylierung der DNA an neuronaler Plastizität und Lernvermögen beteiligt sind.^[220-225]

1.2.3.2. Vorkommen von Tet1

Da Tet1 somit eine wichtige Rolle bei der Gehirnfunktion spielt, ist es nicht überraschend, dass die Expression von Tet1 in Neuronen von der neuronalen Aktivität abhängig ist.^[79-80, 218] Doch nicht nur im Gehirn ist Tet1 zu finden, sondern auch in mESCs^[84, 226, 89] und murinen primordialen Keimzellen, wo Tet1 bei der Beseitigung der genetischen Prägung beteiligt ist.^[227] Eine aktuelle Studie geht außerdem davon aus, dass es zwei verschiedene Isoformen von Tet1 gibt.^[228] Das Volllängenprotein scheint besonders in somatischem Gewebe zu dominieren, während eine N-terminal verkürzte Isoform ohne CXXC-Domäne in frühen Embryos, embryonalen Stammzellen und primordialen Keimzellen auftritt. Diese Aufteilung scheint die Embryonalentwicklung und die Demethylierung der DNA zu regulieren.^[228]

1.2.3.3. Interaktionspartner von Tet1

In mESCs wurde zudem gezeigt, dass Tet1 eine duale Funktion hat. So hemmt Tet1 die Expression Polycomb-assoziiierter Gene und fördert zugleich die Transkription von Pluripotenzgenen.^[88, 210, 212] Beispielsweise scheint Tet1 durch Regulation der Nanog-Expression in die Aufrechterhaltung des pluripotenten Stadiums von embryonalen Stammzellen involviert zu sein.^[180] Es wurde sogar eine physikalische Interaktion von Tet1 mit Nanog festgestellt, welche die Effizienz der Reprogrammierung erhöht.^[229-230] Umgekehrt wird auch die Tet1-Expression von Pluripotenz-assoziierten Faktoren (Oct3/4, Nanog, Myc) kontrolliert.^[123] Ferner bewirkt ein Ausschalten des *Tet1*-Gens in mESCs und Präimplantationsembryonen eine Tendenz zur Trophoektoderm-Differenzierung.^[84, 180] Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Tet1 womöglich eine wichtige Rolle bei der Balance zwischen Pluripotenz und Differenzierung spielt.^[231]

Weiterhin konnten einige Proteine als Interaktionspartner von Tet1 identifiziert werden, welche repressiv auf die Transkription wirken. Diese gehören zu den Proteinkomplexen Sin3a^[232, 216, 233, 88] und NuRD^[216, 189], welche unter anderem eine Histondeacetylase-Domäne besitzen, die das Chromatin in einen dichteren Packungszustand versetzen kann und so die Gentranskription lokal inhibiert.^[181-182, 215, 234-235, 187, 236] Auch konnte gezeigt werden, dass die Bindung von MeCP2 und Mbd2 an die DNA die Oxidation von mC durch Tet1 verhindert, da auf diese Weise die Zugänglichkeit der DNA eingeschränkt wird.^[237]

Neben der Interaktion mit der O-GlcNAc-Transferase (Ogt) (siehe Kapitel 1.2.8.), wurde auch ein Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor Hcfc1 entdeckt. Hierbei wurde gezeigt, dass Ogt vermutlich unterschiedliche Komplexe mit Tet1 und Hcfc1 bildet, um zum einen an Promotoren rekrutiert zu werden und zum anderen die Aktivität von Hcfc1 zu regulieren.^[238]

Ein weiteres Protein, das die Genexpression beeinflusst, ist Ezh2. Es methyliert Lysine in Histonen und hemmt damit die Transkription von Zielgenen.^[239] Ein Zusammenhang zwischen Tet1 und Ezh2 wird zwar vermutet^[240], eine direkte Interaktion konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.^[241, 210] Die durch Tet1 generierten DNA-Modifikationen könnten allerdings indirekt die Bindung von Ezh2 an Promotoren ermöglichen.^[242] Zudem konnte eine Interaktion von Tet1 mit PCNA und der Histondeacetylase HDAC1 in männlichen Keimbahnstammzellen nachgewiesen werden, die ebenfalls Einfluss auf Genexpression und Proliferation hat.^[243]

1.2.4. Tet2

1.2.4.1. Struktur von Tet2

Tet2 hat eine Größe von 1912 Aminosäuren und circa 212 kDa (UniProt *Accession Number*: Q4JK59). Es gibt allerdings Isoformen von unterschiedlicher Größe, die durch alternatives Splicing entstehen können.^[244-245] Des Weiteren besitzt Tet2 keine CXXC-Domäne. Kürzlich wurde zudem eine neun Aminosäuren umfassende RNA-bindende Sequenz identifiziert, welche sich C-terminal der katalytischen Domäne von Tet2 anschließt.^[246] Diese Entdeckung ist von besonderer Bedeutung, da Tet1 ebenfalls eine solche RNA-Bindungsstelle zugesprochen wird^[246] und gezeigt werden konnte, dass Tet-Enzyme auch RNA als Substrat verwenden können.^[247, 204] Es ist also möglich, dass die Tet-Proteine nicht nur in der Lage sind DNA, sondern auch RNA zu modifizieren.

Besonders interessant an Tet2 ist das Fehlen der CXXC-Domäne. Diese hat sich vermutlich im Laufe der Evolution durch eine chromosomale Geninversion von der katalytischen Domäne von Tet2 getrennt und ist nun als eigenständiges Protein IDAX (oder CXXC4) bekannt. Die IDAX CXXC-Domäne interagiert mit der katalytischen Domäne von Tet2, lokalisiert zu Promotoren, sowie CpG-Inseln und bindet DNA, die unmethylierte CpG-Dinukleotide enthält. Überraschend ist dabei die Entdeckung, dass IDAX das Tet2-Level herunterreguliert, indem es Caspasen aktiviert.^[207]

Die katalytische Domäne von Tet2 ist, abgesehen von der CXXC-Domäne von Tet3^[248-249], bisher die einzige Kristallstruktur, die von den Tet-Enzymen bekannt ist. Sieht man sich die Ladungen auf der Oberfläche des Proteins in Abbildung 1.9 genauer an, fällt die DNA-Bindungsstelle deutlich auf. Diese ist durch die weiträumige positive Ladung auf der Proteinoberfläche, welche mit der negativ geladenen DNA-Helix interagieren kann, gut zu erkennen.

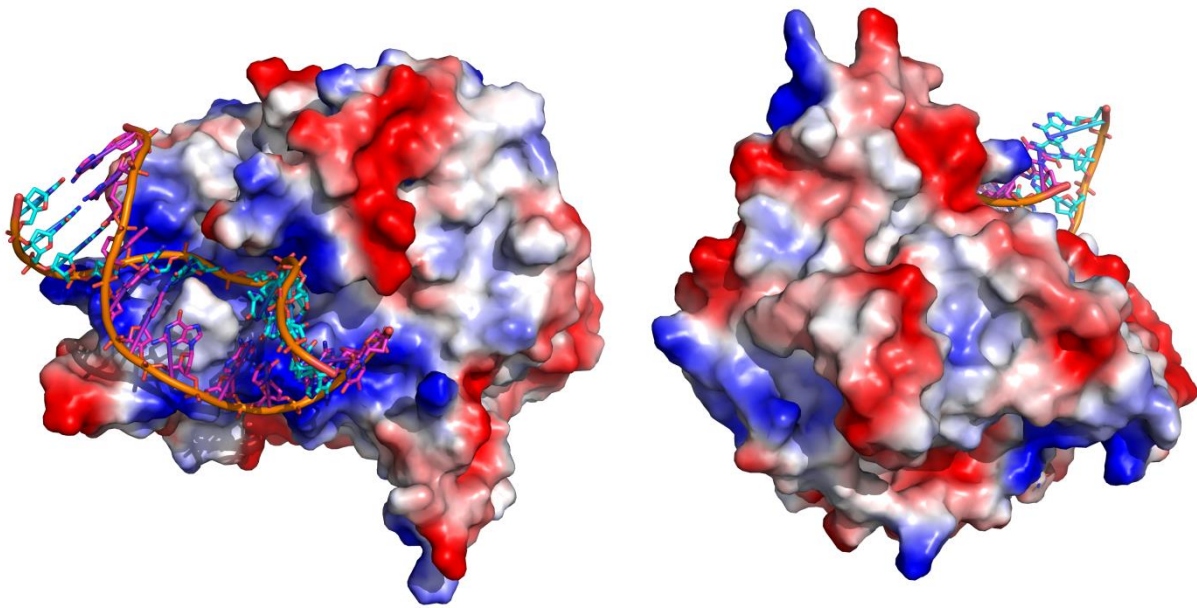


Abbildung 1.9: Die Oberflächenladung der katalytischen Domäne von Tet2 im Komplex mit DNA zeigt mögliche Interaktionsstellen aufgrund positiver (blau) oder negativer (rot) Ladungen (PDB ID: 5D9Y).

1.2.4.2. Vorkommen von Tet2

Ähnlich zu Tet1-, sind auch Tet2-*Knockout*-Mäuse (Tet2^{-/-}) lebensfähig. Allerdings weisen solche Mäuse fehlregulierte hämatopoetische Stammzellen auf und entwickeln myeloische maligne Erkrankungen.^[250] Werden Tet1 und Tet2 gleichzeitig ausgeschaltet (Tet1^{-/-}/Tet2^{-/-}-Doppel*knockout*), sind die resultierenden Mäuse immer noch lebensfähig, zeigen jedoch zum Teil starke Entwicklungsdefekte.^[251]

Neben seiner Expression in mESCs, ist Tet2 das am stärksten exprimierte Tet-Gen in hämatopoetischen Stammzellen und scheint dabei als Tumorsuppressor zu wirken.^[105, 226] Diese Schlussfolgerung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Tet2 eines der am häufigsten mutierten Gene in myeloischen malignen Erkrankungen wie akuter myeloischer Leukämie (AML) und myelodysplastischem Syndrom (MDS) ist.^[252-256, 101, 257-258] Somatische Tet2-Mutationen in Blutzellen scheinen außerdem eine kausale Rolle im Zusammenhang mit Arteriosklerose zu spielen.^[259]

1.2.4.3. Interaktionspartner von Tet2

Tet2 oxidiert mC vorwiegend in intragenischen Regionen.^[92] Eine daraus resultierende Anreicherung von hmC im Genkörper korreliert positiv mit der Transkription.^[91, 68, 92, 94] Des Weiteren interagiert Tet2, im Gegensatz zu Tet1, nicht mit repressiv wirkenden Proteinkomplexen wie Sin3a und NuRD.^[232] Stattdessen konnte eine Interaktion zwischen Tet2 und dem Transkriptionsfaktor WT1 gezeigt werden. WT1 rekrutiert Tet2 zu Zielgenen, um deren Transkription zu aktivieren.^[260] Die Interaktion mit Ogt (siehe Kapitel 1.2.8.) scheint außerdem Auswirkungen auf den H3K4-Methyltransferase-Komplex Set1/COMPASS zu haben. So wird durch die Interaktion das Set1/COMPASS-Protein Hcf1 modifiziert und die Bindung der Set1/COMPASS-Methyltransferase Setd1a an das Chromatin unterstützt.^[232] Auch der Transkriptionsfaktor PU.1 interagiert mit Tet2. Dieser rekrutiert Tet2 ebenfalls zu Genen, die dadurch hypomethyliert werden.^[261] Folglich hat Tet2 im Allgemeinen eine aktivierende Wirkung auf die Genexpression.^[214]

Tet2 bewirkt auch eine Hypomethylierung und damit einhergehend eine Beseitigung von Methylierung der DNA auch bei abnormal methylierter DNA wie beispielsweise bei Krebserkrankungen. Solch aberrant methylierte DNA kann durch oxidativen Stress ausgelöst werden. Es konnte gezeigt werden, dass Tet2 bei oxidativem Stress mit Dnmts interagiert und durch p300-vermittelte Tet2-Acetylierung erhöht abnormale DNA-Methylierungen entfernt. Folglich scheint Tet2 die DNA vor unnatürlicher Methylierung im Zusammenhang mit DNA-Schäden zu schützen.^[262]

1.2.5. Tet3

1.2.5.1. Struktur von Tet3

Tet3 kann in unterschiedlichen Isoformen vorliegen. So gibt es neben Tet3-Proteinen, die eine CXXC-Domäne enthalten, auch eine Spleißvariante ohne CXXC-Domäne (Tet3^{-CXXC}).^[208] Mit einer Größe von 1668 Aminosäuren und etwa 180 kDa, ist Tet3^{-CXXC} das kleinste Protein der Tet-Familie (Abbildung 1.8) (UniProt Accession Number: Q8BG87).

Die CXXC-Domäne von Tet3 ist nicht nur für die Bindung an die DNA verantwortlich,^[248] sondern scheint auch eine regulatorische Funktion zu haben, indem es die Expression und Aktivität von Tet3 kontrolliert.^[207] Interessant ist auch, dass die CXXC-Domäne von Tet3 eine erhöhte Affinität zur Bindung von caC zeigt, was im Zusammenhang mit einer BER-vermittelten Demethylierung via caC

stehen könnte.^[248] Die Kristallstruktur der CXXC-Domäne von Tet3 im Komplex mit DNA ist in Abbildung 1.10 dargestellt.

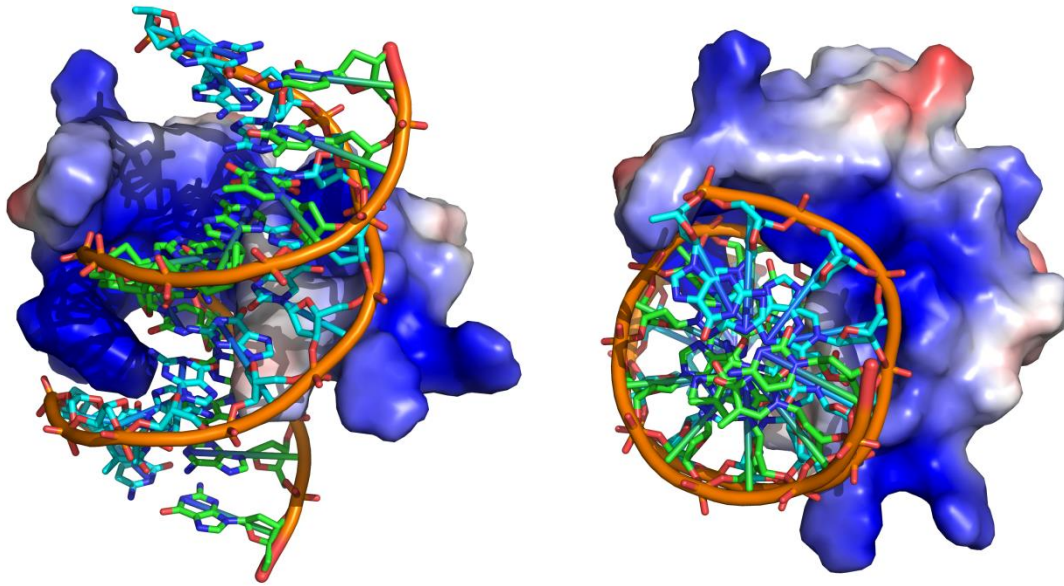


Abbildung 1.10: Die Kristallstruktur der CXXC-Domäne von Tet3 zeigt die Bindung des Zinkfingers an die DNA (PDB ID: 5EXH). Oberflächenladungen des Enzyms sind farbig gekennzeichnet (blau = positiv geladen, rot = negativ geladen).

1.2.5.2. Vorkommen von Tet3

Interessanterweise ist im Gegensatz zu Tet1- und Tet2-*Knockout*-Mäusen, ein Tet3-*Knockout* (Tet3^{-/-}) letal. Ist Tet3 ausgeschaltet, sterben die Mäuse um den Zeitpunkt der Geburt.^[197] Somit ist Tet3 für das Überleben der Mäuse essentiell und scheint eine größere Bedeutung als Tet1 und Tet2 zu haben.

Tet3 ist besonders stark in Oozyten und Zygoten exprimiert,^[197] wo es für die Demethylierung des paternalen Pronukleus nötig ist.^[160, 41] Die Demethylierung der paternalen DNA ist hierbei wichtig, um die Zellpluripotenz wiederherzustellen.^[42] Obwohl alle drei Tet-Proteine zu den erhöhten hmC-Werten in adulten Neuronen beitragen,^[79, 68] ist Tet3 das dominierende Enzym in Gehirnarealen wie dem Cerebellum, Cortex und Hippocampus.^[91, 263] Deshalb ist es auch nicht überraschend, dass Tet3 bei der neuralen Entwicklung und der Entstehung des Auges eine wichtige Rolle spielt.^[264-265, 249] Interessant ist außerdem, dass ein *Knockdown* von Tet3 zur Beeinträchtigung des Angstgedächtnisses führt. Deshalb wird angenommen, dass Tet3 ein Schlüsselregulator für die lernabhängige Akkumulation von hmC ist. Das erhöhte hmC-Level schafft hierbei einen epigenetischen Zustand, der die erfahrungsabhängige Genexpression und schnelle Verhaltensanpassung fördert.^[81]

Während Tet3^{-CXXC} die dominierende Tet3-Isoform im zentralen Nervensystem ist, werden in mESCs und NPCs die Spleißvarianten Tet3 und Tet3^{-CXXC} in vergleichbaren Mengen gebildet.^[208] Die Produktion von Tet3 ist in mESCs zwar schwach, wird allerdings während der Differenzierung schnell hochreguliert.^[266, 226, 208, 118, 267]

1.2.5.3. Interaktionspartner von Tet3

Zusammen mit Tet2 und Ogt (siehe Kapitel 1.2.8.) hat Tet3 Auswirkungen auf den H3K4-Methyltransferase-Komplex Set1/COMPASS. Dabei kommt es zur Modifizierung des Set1/COMPASS-Proteins Hcf1 und zur Förderung der Chromatinbindung der Set1/COMPASS-Methyltransferase Setd1a.^[232]

1.2.6. Das Verhalten der Tet-Proteine während der Embryonalentwicklung

Während der embryonalen Entwicklung, variiert die Tet-Expression stark und beeinflusst dementsprechend die hmC-Level unterschiedlich.^[146, 268, 151] So werden die parental Genome im Anschluss an die Befruchtung der Eizelle nahezu komplett demethyliert, wobei Tet3 für die aktiv-passive Demethylierung zuständig ist.^[197, 269, 159, 41, 270] Tet3 wird hierbei maternal gebildet. Abbildung 1.11 zeigt, dass Tet3 besonders in Oozyten und Zygoten in großen Mengen gebildet wird, während die Tet3-Level im Zwei-Zell-Stadium stark zurückgehen.^[41, 270] Dagegen werden Tet1 und Tet2 vermehrt ab dem Zwei-Zell-Stadium produziert und erreichen ihren Expressionshöhepunkt im Blastozystenstadium.^[172, 198] Da in dieser Phase der Embryonalentwicklung vermehrt DNA *de novo* methyliert wird, könnten Tet1 und Tet2 bei der Änderung des Methylierungsmusters eine Rolle spielen.^[271, 199] Während der Urkeimzellbildung (Tage 9.5 – 13.5 der Embryonalentwicklung) findet eine globale Demethylierungswelle statt^[272-275], bei der die Oxidation von mC durch Tet1 und Tet2 katalysiert wird.^[171] Tet1 und Tet2 werden über den Entwicklungsverlauf positiv durch den Pluripotenzfaktor Oct4 reguliert und sind damit mit dem Pluripotenznetzwerk verknüpft. Differenzieren die Zellen während der Entwicklung, werden Pluripotenz-assoziierte Gene durch Methylierung stillgelegt und die Tet1- und Tet2-Level sinken, wohingegen das Tet3-Level wieder steigt.^[180, 226, 148, 276]

Schaltet man Tet1, Tet2 und Tet3 in embryonalen Stammzellen aus (Tet1^{-/-}/Tet2^{-/-}/Tet3^{-/-}-dreifacher *Knockout*), sind die Zellen in ihrer Fähigkeit, in embryo-ähnliche Aggregate (*embryoid bodies*) und

Teratome zu differenzieren, beeinträchtigt. Dementsprechend konnten die dreifach ausgeschalteten (TKO) embryonalen Stammzellen die Embryonalentwicklung vermutlich aufgrund der beobachteten Promoter-Hypermethylierung und Deregulierung von Entwicklungs-assoziierten Genen nicht mehr durchlaufen.^[277] Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass sich Tet-TKO-Embryos bis zur Gastrulation normal entwickeln können und dass die Tet-abhängige Demethylierung einen Signalweg zur Mesodermentwicklung kontrolliert.^[278] Hierbei scheinen die Tet-Enzyme, die Balance zwischen neuralem und mesodermalem Zellschicksal zu beeinflussen.^[279]

		Tet1	Tet2	Tet3
Embryonalentwicklung	Oozyte	↓	↓	↑↑
	Zygote	↓	↓	↑↑
	Zwei-Zell-Stadium	↑	↑	↓
	Blastozyste	↑↑	↑↑	↓
	Embryonale Stammzellen	↑↑	↑	↓
Gehirn	Neurale Vorläuferzellen	↑	↑	↑
	Cerebellum	↑	↑	↑↑
	Cortex	↑	↑	↑↑
	Hippocampus	↑	↑	↑↑
Organe	Niere	↓	↑↑	↑
	Leber	↓	↑	↑

Abbildung 1.11: Die Bildung der verschiedenen Tet-Proteine variiert während der Entwicklung und in unterschiedlichen Organen. Am Anfang der embryonalen Entwicklung dominiert Tet3, wohingegen im späteren Verlauf Tet1 und Tet2 vermehrt produziert werden. Im Gehirn ist Tet3 wiederum das dominierende Tet-Enzym.

Auch bei der Entwicklung des Gehirns scheinen Tet-Proteine eine wichtige Rolle zu spielen. Dies verdeutlicht ein *Knockdown*-Experiment, bei dem Tet2 und Tet3 im embryonalen Cortex ausgeschaltet wurden und daraufhin neuronale Entwicklungsdefizite auftraten.^[68] Des Weiteren verdeutlicht Abbildung 1.11, dass im Gehirn überwiegend Tet3 gebildet wird. Insbesondere die katalytische Aktivität und funktionale CXXC-Domäne von Tet3 sind für die neurale Entwicklung von großer Bedeutung.^[211] Allgemein variiert die Konzentration an hmC nicht nur in verschiedenen

Gehirnregionen, sondern auch während der Entwicklung und Alterung. Bei der Gehirnentwicklung und mit dem Alter steigt das hmC-Level zusammen mit der Expression von Tet2 und Tet3 an.^[68, 77, 71, 280, 72-73, 263, 74] Insbesondere bei der Entwicklung von Neuronen nimmt das hmC-Level in intragenischen Regionen zu, sodass die Transkription von neuronalen Genen ansteigt.^[91, 68, 93]

In reifen, ausdifferenzierten Geweben sind die Level an Tet1 niedrig, während Tet2 und Tet3 verstärkt produziert werden. Tet3 ist hierbei besonders stark in zahlreichen somatischen Zelltypen und Geweben, insbesondere NPCs und Neuronen, vertreten.^[68, 264, 208, 249]

Zusammenfassend spielen die Tet-Enzyme und die einhergehende Veränderung der DNA demzufolge eine große Rolle bei der Regulierung des Epigenoms und der Embryonalentwicklung.^[277, 251, 217, 197, 250, 88, 210] Außerdem scheinen sie in den Wachstumsprozess involviert zu sein, da gezeigt werden konnte, dass *Tet1* mit der Größe eines Erwachsenen und dessen Länge bei der Geburt assoziiert ist.^[281] Tet-Proteine beeinflussen jedoch nicht nur die Entwicklung des Organismus, sondern auch die Entwicklung von Krankheiten.

1.2.7. Rolle der Tet-Proteine in der Pathogenese

Eine abnormale DNA-Methylierung spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Krankheiten, wie Krebs^[282-289], Diabetes, Autoimmunerkrankungen und neuronalen Entwicklungsstörungen.^[290-291, 98] Durch die Methylierung von DNA-Abschnitten werden zum Beispiel Tumorsuppressor-, Apoptose-, Zellzykluskontroll-, Signaltransduktions- oder DNA-Reparatur-Gene inaktiviert.^[28, 291] Folglich sind therapeutische Ansätze von großem Interesse, welche die Hypermethylierung rückgängig machen können.^[292] Doch auch eine DNA-Hypomethylierung kann die Pathogenese unterstützen. So werden bei zahlreichen Krebsarten Onkogene durch eine Hypomethylierung aktiviert.^[293-294, 285, 287]

Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass Tet-Enzyme hierbei auch eine Rolle spielen, da sie in der Lage sind das Methylierungsmuster der DNA zu beeinflussen.^[295-301] Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Hypoxie die Tet-Aktivität vermindert und dadurch zu hypermethylierter DNA in Tumoren führt.^[302] Ein weiterer Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Tet-Enzymen und Krebserkrankungen ist zum Beispiel die ebenfalls aberrante DNA-Hydroxymethylierung, welche in Karzinomen auftritt.^[302] So zeigen Krebsgewebe im Gegensatz zu normalen Geweben niedrigere hmC-Level.^[78, 99-100] Dies schließt auf eine Störung der Tet-Aktivität.^[303-304] Solch ein Defekt kann beispielsweise durch eine Mutation im *Tet*-Gen hervorgerufen werden.^[305] Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass mutiertes, humanes TET2 ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) verursachen

kann.^[306] Bei dieser Krankheit handelt es sich um eine Vorstufe der Leukämie, wobei vermehrt unreife Blutzellen entstehen.^[307-308] Wird Tet2 in Mäusen ausgeschaltet, ist dementsprechend eine erhöhte Proliferation hämatopoetischer Stammzellen festzustellen.^[306] Neben Mutationen und Deletionen, wurden in kranken Geweben oft niedrige Expressionslevel der *Tet*-Gene detektiert, weshalb man auch von Tumorsuppressorgenen sprechen kann.^[309, 103, 203, 105, 226, 106, 244, 250, 99, 310, 177, 311-312, 179] Solche Beobachtungen wurden bisher allerdings nur für Tet1 und Tet2 gemacht. Das liegt möglicherweise daran, dass Veränderungen an Tet3 eine gesteigerte Lethalität zur Folge haben würden.^[179] Aberrante hmC- und Tet-Level im Gehirn von Patienten, die unter Krankheiten wie Chorea Huntington,^[313-318] Fragiles-X-Syndrom,^[319] Friedreich-Ataxie^[320] oder Psychose^[321-322] leiden, deuten außerdem daraufhin, dass Tet-Proteine eine Rolle bei neurologischen Störungen spielen.^[323-325]

Doch nicht nur Mutationen können die Funktion der Tet-Enzyme beeinflussen. Auch die Verfügbarkeit des Cosubstrats α -Ketoglutarat oder eines Inhibitors haben Einfluss auf die katalytische Tet-Aktivität. Bei verschiedenen Tumoren wurde beispielsweise eine mutierte Variante der Idh identifiziert, die normalerweise α -Ketoglutarat aus Isocitrat als Bestandteil des Citratzyklus bildet.^[326, 305, 327-328] Die Mutation jedoch bewirkt eine Veränderung dieser Reaktion, sodass nicht α -Ketoglutarat, sondern 2-Hydroxyglutarat entsteht.^[329, 328, 330] 2-Hydroxyglutarat ist ein Onkometabolit, der α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen und somit auch die Tet-Enzyme kompetitiv inhibiert.^[185, 109] Der Mangel an α -Ketoglutarat und die Inhibition der Tet-Proteine durch 2-Hydroxyglutarat, verändern die Tet-Aktivität, sodass es zu einer Hypermethylierung der DNA und einem Sinken des hmC-Levels kommt.^[101, 304, 298]

Neben der Idh, können auch andere Citratzyklus-Enzyme mutieren und so die Aktivität der Tet-Proteine beeinflussen.^[331] Beispielsweise können die Succinat-Dehydrogenase^[332], sowie die Fumarat-Hydratase^[333-335] mutiert und somit inaktiv vorliegen. Solche Mutationen und die daraus resultierende Anreicherung an Fumarat und Succinat konnten in verschiedenen Krebszellen beobachtet werden. Die auf diese Weise abnormal gesteigerten Mengen an Fumarat und Succinat können wiederum nachweislich α -Ketoglutaratabhängige Dioxygenasen wie die Tet-Enzyme inhibieren.^[185, 336-337]

1.2.8. Regulation der Aktivität der Tet-Enzyme

Neben der soeben besprochenen Wirkung von aberranten Metaboliten auf die Aktivität der Tet-Enzyme, ist bisher wenig über die Regulation der Tet-Proteine bekannt. Möglich wäre beispielsweise ein regulativer Mechanismus über die Expressionsrate^[268], posttranslationale Modifikationen, kleine RNAs, Proteininteraktionen oder die Verfügbarkeit des Cosubstrats α -Ketoglutarat.^[338]

Zuletzt wurde ein Zusammenhang zwischen Vitamin C und der Prozessivität der Tet-Proteine hergestellt.^[339-341] Befindet sich Vitamin C im Kulturmedium, steigen die Level aller mC-Oxidationsprodukte in mESCs an. Dementsprechend ist Vitamin C, vermutlich als Reduktionsmittel, um das Eisenion im Fe^{2+} -Zustand zu halten, für eine volle Aktivität der Tet-Enzyme nötig.^[339-340, 342] Neben Vitamin C, ist auch Vitamin A (Retinol) in der Lage, die Tet-Proteine zu beeinflussen. So aktiviert es die Transkription von Tet2 und Tet3 in embryonalen Stammzellen, wodurch vermehrt hmC gebildet wird.^[340]

Neben kleinen Molekülen wie Vitamin A/C oder 2-Hydroxyglutarat (siehe Kapitel 1.2.7), können kleine RNA (microRNA oder miRNA) ebenfalls die Regulation der Tet-Enzyme beeinflussen.^[343-346, 312] Auch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung^[347], O-GlcNAcylierung^[348, 347, 216, 349] und Ubiquitylierung^[350], können Einfluss auf die Aktivität der Tet-Proteine haben. Hierbei zeigen die verschiedenen Tet-Enzyme jeweils unterschiedliche Modifikationsmuster. Diese Modifikationen können wiederum in verschiedenen Kombinationen auftreten. Solche Kombinationen aus posttranslationalen Modifikationen ermöglichen eine schnelle Anpassung der Lokalisierung und Aktivität der Tet-Proteine auf externe Stimuli.^[347]

Die bekannteste Modifikation der Tet-Proteine ist hierbei die O-glykosidische Bindung eines β -D-N-Acetylglukosamins an einen Serin- oder Threoninrest. Diese Reaktion wird durch Ogt katalysiert.^[351] Die Interaktion zwischen Ogt und den Tet-Enzymen konnte bereits mehrfach festgestellt werden.^[352, 214, 232, 238] Es konnte auch gezeigt werden, dass die O-GlcNAcylierung, die Konzentration an Tet1 und dessen Oxidationsprodukt hmC positiv reguliert.^[216] Die Interaktion mit Ogt beeinflusst jedoch nicht nur die O-GlcNAcylierung der Tet-Proteine selbst,^[348, 347, 353, 216, 349] sondern auch die O-GlcNAcylierung anderer Ziele, wie des Serinrests 112 des Histons H2B.^[214, 196] Wird Tet2 beispielsweise herunterreguliert, so sinkt die Zahl der O-GlcNAcylierten H2BSer112-Reste, welche mit einer aktiven Transkription assoziiert sind.^[214, 196] Die Tet2-Ogt-Interaktion vermittelt außerdem die Übertragung von β -D-N-Acetylglukosamin auf Serin- oder Threoninreste unterschiedlicher chromatinmodifizierender Enzyme und hat dadurch Einfluss auf deren Aktivität.^[214, 232, 238] Ferner

scheint Ogt für den nukleären Export von Tet3 und damit für die Inhibition der mC-Oxidation verantwortlich zu sein.^[349]

Kürzlich wurden zudem Calpaine als Regulatoren der Tet-Enzyme identifiziert. Diese Regulation findet auf posttranslationaler Ebene während der Differenzierung von mESCs zu NPCs statt. Calpaine sind Calcium-abhängige Proteasen, welche in der Lage sind die Tet-Proteine zu degradieren. Obwohl alle drei Tet-Enzyme Substrate für Calpaine darstellen, gibt es doch Unterschiede zwischen den Tet-Proteinen. So werden Tet1 sowie Tet2 von Calpain1 in mESCs und Tet3 von Calpain2 während der neuralen Differenzierung reguliert.^[276]

Auch Interaktionen mit Proteinen, welche die Tet-Enzyme kontextspezifisch zur DNA rekrutieren, modulieren die Tet-Aktivität. Der Transkriptionsrepressor REST/NRSF dirigiert beispielsweise Tet3 an die DNA, sodass diese hydroxymethyliert und somit die Genexpression induziert wird.^[265] Auch wird spekuliert, ob die Tet-Enzyme mit Hilfe der aktivierungsinduzierten Cytidin-Desaminase (Aid) in das Cytoplasma befördert werden und somit ihre subzelluläre Lokalisation reguliert wird.^[354] Ein weiteres Protein, das die Aktivität der Tet-Enzyme beeinflussen kann, ist PGC7 (oder Dppa3 beziehungsweise Stella).^[355] Dieses Protein schützt die methylierte DNA des mütterlichen Pronukleus.^[356, 270] Es interagiert mit Tet2 und Tet3, um deren enzymatische Aktivität zu unterdrücken und so die DNA-Methylierung zu schützen.^[355] Zur Beeinflussung der Tet1-Aktivität durch Uhrf2 gibt es unterschiedliche Studien. So scheint eine Co-Expression der beiden Enzyme die Tet-Aktivität zu stimulieren^[48]. *In vivo* bindet Uhrf2 zwar hmC, ohne jedoch einen Effekt auf die enzymatische Aktivität von Tet1 zu haben.^[357]

Eine Übersicht über die Regulationsmöglichkeiten der Tet-Proteine ist in Abbildung 1.12 dargestellt.

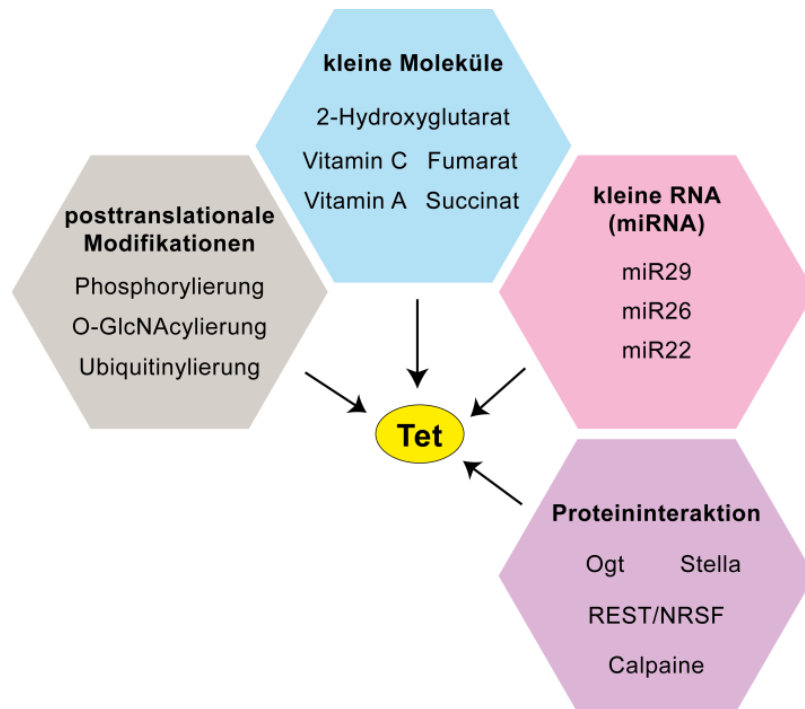


Abbildung 1.12: Auswahl an Einflussfaktoren auf die Aktivität der Tet-Enzyme. Posttranslationale Modifikationen, sowie die Interaktion mit kleinen Molekülen, RNA und Proteinen können die Tet-Aktivität beeinflussen.

Unter anderem wegen ihrer Interaktionen mit anderen Proteinen, wird den Tet-Enzymen eine duale Funktion zugesprochen.^[80, 241, 210, 231] Dass die Tet-Proteine neben ihrer katalytischen Funktion auch andere Aufgaben ausüben, legt die beobachtete Diskrepanz in der Verteilung von Tet-Enzymen und oxidierten mCs im Genom nahe.^[151] Solche von der katalytischen Funktion unabhängigen Aufgaben können beispielsweise Regulationsfunktionen sein. So führt etwa die Überexpression einer katalytisch inaktiven Variante von Tet1 ebenso zur Hochregulierung von Zielgenen wie das Originalprotein.^[80]

Um die unterschiedlichen Funktionen der Tet-Enzyme zu entschlüsseln, hilft deshalb die Identifizierung der Proteine, die mit den Tet-Varianten interagieren. Dass die verschiedenen Tet-Proteine jeweils spezifische biologische Funktionen ausüben können, lässt die heterogene Expression der einzelnen Tet-Varianten in diversen Organen sowie Zelltypen und während der Entwicklung vermuten (siehe Kapitel 1.2.6).^[146, 268, 151] Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Interaktionspartner der Tet-Enzyme zu identifizieren, um dadurch Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Tet-Varianten zu ermöglichen.

1.3. Proteomik-basierte Identifizierung von Interaktionspartnern

Um das Interaktom der Tet-Enzyme zu identifizieren, eignen sich Methoden aus dem Feld der Proteomik. Die Proteomik versucht mit Hilfe von biochemischen, massenspektrometrischen und computerbasierten Methoden das Proteom, also die Gesamtheit der Proteine in der Zelle, zu erforschen. Ist das Interaktom bestimmter Proteine von Interesse, so spricht man von Interaktionsproteomik. Dazu werden meist zuerst die Interaktoren des zu untersuchenden Proteins beispielsweise durch eine Affinitätsaufreinigung isoliert. Anschließend erfolgt die Analyse der interagierenden Proteine mittels Massenspektrometrie. Zuletzt werden die entstandenen Daten ausgewertet und somit die Interaktoren identifiziert. Eine Quantifizierung der Proteine wird ermöglicht, indem man Quantifizierungsmarker einsetzt oder markierungsfreie Quantifizierung (*label-free quantification*, LFQ) verwendet.^[358-360]

1.3.1. Klassische Co-Immunpräzipitation zur Selektion der Interaktionspartner

Zur Isolation der Interaktionspartner eines bestimmten Proteins kann man die klassische Co-Immunpräzipitation (Co-IP) nutzen. Dabei wird das Zielprotein mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gebunden. Soll beispielsweise ein Zelllysate untersucht werden, wird der Antikörper mit der Proteinlösung inkubiert und bindet so das Protein von Interesse. Doch nicht nur das Antigen wird an den Antikörper gebunden, sondern auch die Interaktionspartner des zu untersuchenden Proteins, da diese nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem Zielprotein eingehen. Mittels Protein A oder G Partikeln kann der Fc-Teil des Antikörpers gebunden und somit das Antigen mit seinen Interaktoren copräzipitiert werden, wie in Abbildung 1.13 illustriert.^[361-363]

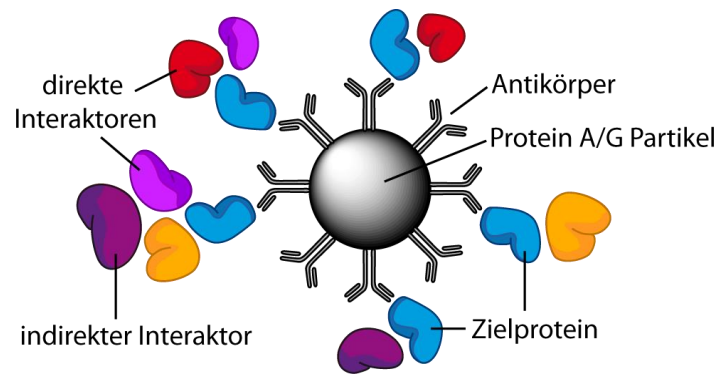


Abbildung 1.13: Schematische Darstellung des Prinzips der Co-Immunpräzipitation. Antikörper binden mit ihrem Fab-Teil das zu untersuchende Protein und mit ihrem Fc-Teil Protein A oder G Partikel. Dadurch werden sowohl das Zielprotein, wie auch dessen direkte und indirekte Interaktoren präzipitiert.

Auf diese Weise können endogene Proteinkomplexe aus unterschiedlichen Zelltypen, Zellstadien oder Geweben isoliert werden. Nachteile der klassischen Co-IPs sind beispielsweise die gleichzeitige Präzipitation von direkten und indirekten Interaktoren, sowie nicht nur spezifischer, sondern auch unspezifischer Proteine, welche an den Antikörper oder die Partikel binden. Dadurch besteht bei der Co-IP ein hohes Risiko, falsch positive Ergebnisse zu erzielen. Auch kann es sein, dass der Antikörper das Epitop des Antigens bindet, welches für die Wechselwirkung mit Interaktoren essentiell ist und damit durch den Antikörper blockiert ist.^[364] Gleichmaßen spielt auch die Abundanz des zu untersuchenden Proteins eine große Rolle. Ist das Protein von Interesse nur in sehr kleinen Mengen im Zelllysat vorhanden, so ist es schwierig, für die Messung ausreichende Mengen des Zielproteins und dessen Interaktionspartnern zu präzipitieren. Versucht man die Ausbeute an dem Protein von Interesse durch eine Überexpression desselbigen zu erhöhen, verändert man dadurch die natürliche Situation der Zelle und riskiert auch einen Anstieg falsch positiver Interaktoren.^[365] Die Methode beruht außerdem stark auf der Spezifität des Antikörpers, sodass das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen das Zielprotein Voraussetzung ist.^[364] Obwohl es viele kommerzielle Antikörper gibt, die für Immunpräzipitation geeignet sein sollen, sind sie doch in den meisten Fällen nicht ausreichend validiert, sehr teuer und nicht spezifisch genug.^[366-368] Es ist daher vorteilhaft, das Protein von Interesse mit einem *Tag* auszustatten, sodass beispielsweise ein gegen den *Tag* gerichteter Antikörper verwendet werden kann. Diese sind meist hochqualitative, hochspezifische und mehrfach validierte Antikörper, welche unabhängig von dem Zielprotein verwendet werden können.^[364]

1.3.2. Shotgun-Proteomik zur Identifizierung der Interaktionspartner

Sind die Proteine, beispielsweise durch eine Co-IP, selektiert, so können sie mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert werden. Im *Bottom-up Shotgun-Proteomik*-Ansatz werden die Proteine zunächst enzymatisch verdaut und die resultierenden Peptide anschließend in einem Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometer (LC-MS) analysiert. Schlussendlich führen bestimmte Algorithmen eine Datenbank-basierte Proteinidentifikation durch.^[369] Das Prinzip der *Shotgun-Proteomik* ist in Abbildung 1.14 schematisch zusammengefasst.

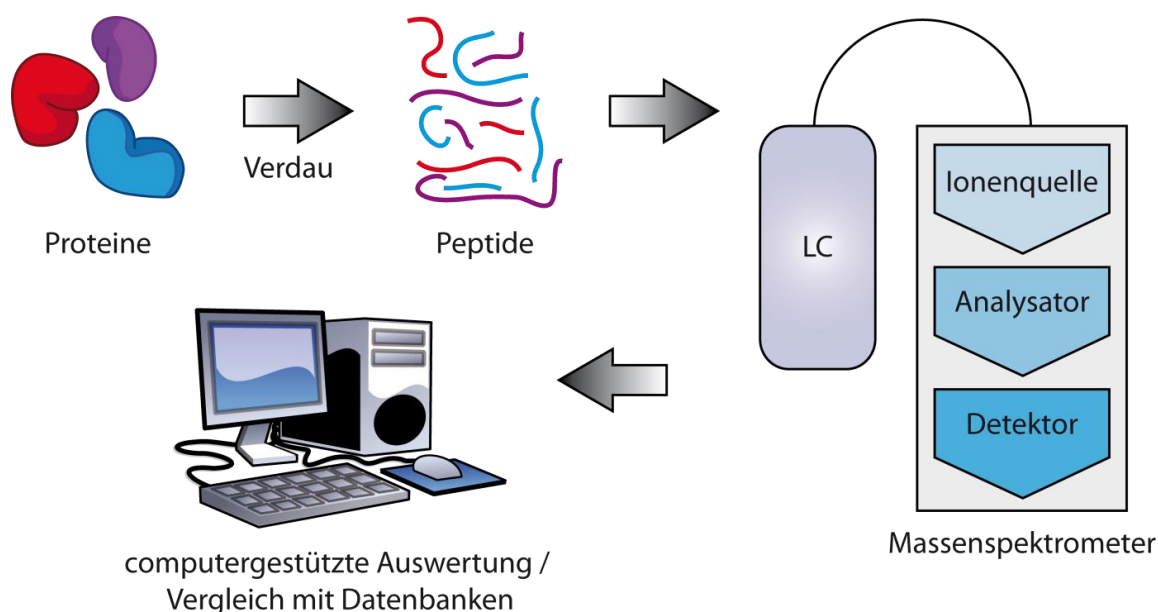


Abbildung 1.14: Schematischer Ablauf der Bottom-up Shotgun-Proteomik. Proteine werden zu Peptiden verdaut und anschließend mittels Flüssigkeitschromatographie (LC) aufgetrennt. Gemessen werden die Proben in einem Massenspektrometer, das aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor besteht. Zuletzt werden die Proteine *in silico* durch den Vergleich mit Datenbanken identifiziert.

Zur Messung der Peptide via LC-MS werden diese erst mittels Flüssigkeitschromatographie (LC) aufgetrennt, um eine sequentielle Analyse zu ermöglichen.^[370] Die auf diese Weise nach und nach eluierten Peptide werden dann durch Elektrospray-Ionisation (ESI) in die Gasphase gebracht und ionisiert.^[371-372] Die generierten Ionen werden im Massenspektrometer mit Hilfe eines Massenanalysators und einem Detektor die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z) und Intensitäten gemessen.^[373-374] Um eine genaue Identifizierung der Peptide zu ermöglichen, werden die signalintensivsten Peptide durch einen Massenanalysator selektiert und durch verschiedene Methoden fragmentiert.^[375] Die Massenspektren dieser entstandenen Fragmente werden auch MS/MS- oder MS²-Spektren genannt. Die generierten Daten können letztendlich mit Hilfe einer

geeigneten Software wie MaxQuant über den Vergleich mit einer Datenbank ausgewertet und auf diese Weise die Proteine identifiziert werden.^[376, 369]

Im Gegensatz zum *Top-down* Verfahren, bei dem unverdaute Proteine intakt im Massenspektrometer gemessen werden,^[377] ist die *Bottom-up Shotgun*-Methode experimentell weniger aufwendig.^[378] Auch können Peptide aufgrund besserer Ionisierbarkeit im Vergleich zu kompletten Proteinen meist einfacher im Massenspektrometer analysiert werden.^[379] Der *Top-down* Ansatz hat den Vorteil, Informationen über das intakte Protein zu sammeln,^[378] wohingegen das *Bottom-up Shotgun*-Proteomik-Verfahren sich besser zur Identifizierung und Quantifizierung von großen, komplexen Proteingemischen eignet.^[369]

1.3.3. LFQ zur Quantifizierung der Interaktionspartner

Um die Abundanz der mittels Massenspektrometrie identifizierten Interaktoren des Zielproteins zu bestimmen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Viele der Quantifizierungsverfahren nutzen schwere Isotopenmarkierungen, um Quantitätsverhältnisse zu bestimmen. Um die aufwendige und teure Quantifizierung mittels Isotopen zu umgehen, kann stattdessen eine LFQ durchgeführt werden.^[360] Diese Quantifizierungsmethode hat den Vorteil, dass keine zusätzlichen Arbeitsschritte zur Markierung oder dem Einbringen von Standards durchzuführen sind und somit Zeit, Kosten, Kontaminationen und Materialverlust minimiert werden. Auch bleibt die Komplexität der Spektren minimal im Vergleich zu Quantifizierungsmethoden, welche Modifikationen oder Standards in die Proben einführen.^[380] Außerdem ist es durch LFQ möglich, Proben zu messen, die nicht markiert werden können.^[359] Im Gegensatz zu den limitierten Multiplexen der Quantifizierungsmarker, gibt es bei der LFQ zudem keine Begrenzung der Anzahl an Proben, welche verglichen werden sollen.^[381]

Es gibt einige Ansätze zur LFQ, welche entweder auf der Peptidintensität (*peptide intensity*)^[382] oder dem Zählen von Spektren (*spectral counting*)^[383-384] basieren.^[385] Diese Methoden nutzen die Korrelation zwischen Proteinabundanz und der Signalintensität beziehungsweise der Anzahl an Fragmentierungen eines Analyten.^[384, 369] Da diese auf dem Vergleich aller Proben basieren, ist für solche Ansätze nicht nur ein reproduzierbarer LC-Ablauf, sondern auch eine strikt einzuhaltende Probenaufbereitung mit gleichen Bedingungen, enger Zeitabfolge und minimaler Fraktionierung Voraussetzung.^[359, 386] Viele dieser Methoden sind zudem für spezielle biologische Fragestellungen konzipiert und eventuell nicht für eine anderweitige Verwendung geeignet.^[387] Ferner können aufgrund der geringeren Genauigkeit dieser LFQ-Methoden gegenüber der Quantifizierung mittels stabiler Isotopen kleine Veränderungen im Proteom meist nicht detektiert werden.^[359]

Die MaxLFQ-Funktion, welche in der MaxQuant Software implementiert ist^[376], beruht auf neuartigen Algorithmen, um die LFQ im Hinblick auf die angesprochenen Probleme zu optimieren. Zwei davon sollen im Folgenden skizziert werden.

In einem ersten Prozess werden Probenfraktionen *normalisiert*. Nach vorangegangenen Trennungen sind die einzelnen Probenfraktionen eventuell etwas verschieden behandelt und mit ungleichen massenspektroskopischen Leistungen analysiert worden. Die dabei entstandenen Unterschiede bei den Messwerten sollen durch Ausgleichsfaktoren $N_{S,F}$ berücksichtigt werden, die von der Probe S (für Sample) und der Fraktion F , aber nicht vom einzelnen Peptid P abhängen. Nur mit diesen Ausgleichsfaktoren und allen nicht weiter vorbehandelten Messwerten (*delayed normalization*) zu den Peptiden P in den Probenfraktionen bildet man einen Term H . Er ist so gebaut, dass er zwei besondere Eigenschaften hat:

- (1) Er wird dominiert durch das gemeinsame Verhalten fast aller Peptide. D.h. der Großteil des Proteoms wird als Standard verwendet.^[359] Das Verfahren arbeitet folglich nur dann gut, wenn sich die Proben nur in wenigen Peptiden unterscheiden.
- (2) Mit bekannten mathematischen Optimierungsverfahren gemäß der kleinsten Fehlerquadrate kann man aus H die Faktoren $N_{F,P}$ bestimmen.

In einem zweiten Prozess macht die MaxLFQ-Methode eine sehr hohe Quantifizierungsgenauigkeit möglich, indem die größtmögliche Verhältnisinformation der Peptidsignale in einer beliebigen Anzahl an Proben extrahiert wird (*Extraction of Maximum Peptide Ratio Information*). Dieser zweite Algorithmus nutzt die gesamte Information aus den Verhältnissen der Peptide aller Proben, ohne auf willkürliche Signalzuordnung zurückzugreifen, wenn ein Peptidsignal nicht detektiert werden konnte.^[359]

Werden beispielsweise mindestens zwei Peptidspezies eines Proteins in mindestens zwei Proben detektiert, wie in Abbildung 1.15 dargestellt, so können die beiden in Relation zueinander gesetzt werden (Man kann vorwählen, ob bereits bei einer Übereinstimmung in einem oder erst in mehr als zwei Peptiden eine Relation gebildet werden soll). Der Median dieser Peptidverhältnisse definiert das paarweise Proteinverhältnis. Über die Gesamtheit der paarweisen Proteinverhältnisse aller Proben, kann nun mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate ein Abundanzprofil errechnet werden. Dieses Profil wird über die kumulative Intensität aller Proben neu skaliert, um eine sogenannte LFQ-Intensität des Proteins zu erhalten.^[359]

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	
Peptidspezies 1	+	+		↔ paarweises Proteinverhältnis Probe 1 / 2
Peptidspezies 2	+	+	+	
Peptidspezies 3		+	+	↔ paarweises Proteinverhältnis Probe 2 / 3

Abbildung 1.15: Paarweise Proteinverhältnisse können errechnet werden, wenn zum Beispiel von einem Protein mindestens zwei Peptidspezies in mindestens zwei Proben detektiert wurden.

Zusammengefasst ist die MaxLFQ-Methode durch ihre neuartigen Algorithmen zur Verbesserung der LFQ sehr gut für die Quantifizierung von Proteomik-Experimenten geeignet.^[388] Die besten Ergebnisse werden hierbei mit drei oder mehr Replikaten generiert.^[359] Wie die LFQ und die Identifizierung von Interaktionspartnern experimentell gelingt, wird in den folgenden Kapiteln erläutert.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, die Regulation der Tet-Enzyme näher zu untersuchen. Die Veränderung der DNA, in diesem Fall durch modifizierte Cytosinbasen, muss streng reguliert sein, um möglichen DNA-Schäden oder aberranter Genexpression vorzubeugen. Folglich muss es Kontrollsysteme für Enzyme geben, die in der Lage sind, die DNA zu verändern. Fundierte Rückschlüsse über die Regulation der Tet-Enzyme kann die Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern geben. Zu diesem Zweck sollte eine neuartige Methode etabliert werden, die es erlaubt, Tet-Interaktoren aus Zellen und Geweben zu isolieren und nachzuweisen. Die interagierenden Proteine sollen mittels Massenspektrometrie-basierter Proteomik analysiert werden und interessante Interaktoren zur Verifizierung und weiteren Erforschung der Funktion ausgewählt werden.

Zusätzlich soll untersucht werden, inwiefern sich Tet1, Tet2 und Tet3 im Hinblick auf ihre Reaktivität und ihren funktionellen Kontext unterscheiden. Dazu sollen die Interaktome der einzelnen Tet-Enzyme analysiert und miteinander verglichen werden. Unterschiede in den Interaktoren könnten auf diese Weise Hinweise auf Regulationsmöglichkeiten und Funktionen der verschiedenen Tet-Proteine liefern.

Um überdies etwas über die Tet-Enzyme in verschiedenen Geweben und Zelltypen zu lernen, sollen die Tet-Interaktome in unterschiedlichen Zellen und Organen bestimmt werden. Da die Tet-Proteine besonders während der Embryonalentwicklung eine große Rolle spielen (siehe Kapitel 1.2.6), sollen mESCs und NPCs in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung untersucht werden. Auf diese Weise können Unterschiede in den Tet-Interaktoren in undifferenzierten im Vergleich zu differenzierten Zellen entdeckt werden. Darüber hinaus sollen Gehirn- und Retinaprobe analysiert werden, da die Tet-Enzyme, wie bereits in Kapitel 1.2.6 beschrieben, die Entwicklung des Gehirns beeinflussen können.

3. Material und Methoden

Um die Interaktionspartner der Tet-Enzyme zu analysieren, sind sowohl biochemische als auch massenspektrometrische Methoden erforderlich. Diese werden in den nachfolgenden Ausführungen im Detail beschrieben.

3.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in den Qualitätsstufen *puriss*, *p.a.*, *purum* und *molecular biology grade* von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma/Aldrich/Fluka (Deisenhofen), AppliChem (Darmstadt) und Jena Bioscience (Jena) bezogen soweit nicht anders angegeben. Durch eine Milli-Q-Plus-Anlage der Firma Merck Millipore (Darmstadt) bidestilliertes Wasser (bidest. H₂O) wurde für die Herstellung von Puffern und Lösungen genutzt. Für Puffer, Lösungen und Proben zur massenspektrometrischen Analyse wurde Wasser in LC-MS-Qualität der Firma Fluka (St. Louis, MO, USA) und Acetonitril in LC-MS-Qualität der Firma Carl Roth (Karlsruhe) verwendet.

3.2. Antikörper

Tabelle 3.1.: Verwendete Antikörper

Antikörper	Antigen	Art	Quelle	Qualität	Bezugsquelle
Alexa488-Anti-Kaninchen	Kaninchen-IgG	poly-klonal	Ziege	F(ab') ₂ -Fragmente wurden aus Ziegen-Antikörpern aufbereitet, die an vereinigte Human- und Maus-Seren, Plasmozytom/Hybridom-Proteine und aufgereinigte humane Paraproteine banden	Cell Signaling Technologies (Cambridge, UK) (#4412)
Alexa488-Anti-Maus	Maus-IgG	poly-klonal	Ziege	F(ab') ₂ -Fragmente wurden aus Ziegen-Antikörpern aufbereitet, die an Human-Immunglobulin G (IgG) und -Serum banden	Cell Signaling Technologies (Cambridge, UK) (#4408)
Alexa488-Anti-Ratte	Ratte-IgG	poly-klonal	Ziege	IgG wurde aus Ziegen-Antikörpern aufbereitet, die an Maus-IgG, Maus- und Human-Serum banden	Cell Signaling Technologies (Cambridge, UK) (#4416)
Alexa555-Anti-Kaninchen	Kaninchen-IgG	poly-klonal	Ziege	F(ab') ₂ -Fragmente wurden aus Ziegen-Antikörpern aufbereitet, die an vereinigte Human- und Maus-Seren, Plasmozytom/Hybridom-Proteine und aufgereinigte humane Paraproteine banden	Cell Signaling Technologies (Cambridge, UK) (#4413)

3. Material und Methoden

Alexa555-Anti-Maus	Maus-IgG	poly-klonal	nicht spezifiziert	nicht spezifiziert	Cell Signaling Technologies (Cambridge, UK) (#9641)
Alexa555-Anti-Ratte	Ratte-IgG	poly-klonal	Ziege	IgG wurde aus Ziegen-Antikörpern aufbereitet, die an Maus-IgG, Maus- und Human-Serum banden	Cell Signaling Technologies (Cambridge, UK) (#4417)
Anti-Aconitase2 (6F12BD9)	Aconitase 2	mono-klonal	Maus	aufgereinigt durch biochemische Fraktionierung	Abcam (Cambridge, UK) (ab110321)
Anti-FACT/Supt 16H	synthetische Peptidsequenz (DLTNKEGKKPEEK), die den internen Aminosäureresten von Supt16H entspricht	poly-klonal	Ziege	aufgereinigt durch Antigen-Affinitätschromatographie	Thermo Fisher (Rockford, IL, USA) (PA5-18443)
Anti-GFP	synthetisches GFP-Peptid	poly-klonal	Kaninchen	aufgereinigt durch Protein-A- und Peptid-Affinitätschromatographie	Cell Signaling Technologies (Cambridge, UK) (#2555)
Anti-Glud	synthetische Peptidsequenz (ESEEQKRNRVRGILR), die den internen Aminosäureresten von Glud1/2 entspricht	poly-klonal	Ziege	aufgereinigt durch Antigen-Affinitätschromatographie	Thermo Fisher (Rockford, IL, USA) (PA5-19267)
Anti-Got2 (3E9)	aufgereinigtes, rekombinantes Fragment von in Escherichia coli produziertem GOT2	mono-klonal	Maus	nicht spezifiziert	Thermo Fisher (Rockford, IL, USA) (MA5-15595)

3. Material und Methoden

Anti-H3K9me3	Peptid, das Trimethyl- lysin 9 von Histon H3 enthält	poly- klonal	Kanin- chen	Protein-A-Chromato- graphie	Active Motif (#39765)
Anti-Kaninchen-IgG	Kaninchen-IgG	poly- klonal	Ziege	affinitätsgereinigt	Sigma/Aldrich /Fluka (Deisenhofen) (A6667)
Anti-Maus-IgG	Maus-IgG	poly- klonal	Schaf	affinitätsgereinigt	GE Healthcare (Little Chalfont, UK) (NA931)
Anti-PP1- gamma (Anti-Ppp1cc)	rekombinantes Fragment, das einer Region zwischen Aminosäurerest 2 und 227 von Ppp1cc entspricht (Uniprot ID: P36873)	poly- klonal	Kanin- chen	aufgereinigt durch Antigen-Affinitätschro- matographie	Thermo Fisher (Rockford, IL, USA) (PA5- 21671)
Anti-Tet1	rekombinantes Protein, das einer Region zwischen Aminosäure- rest 1682 und 1914 von Tet1 entspricht	mono- klonal	Ratte	Protein-G- Chromatographie	Active Motif (#61741)
Anti-Tet3	C-terminale Region von TET3	mono- klonal	Maus	als Aszites bereitgestellt	Abiocode (Agoura Hills, CA, USA) (M1092-3)
Anti-Tet3	PrEST Antigen TET3 (rekombinantes Fragment von TET3)	poly- klonal	Kanin- chen	affinitätsgereinigt	Sigma/Aldrich /Fluka (Deisenhofen) (HPA050845)

Anti-Tet3	N-terminale Region von Tet3	mono-klonal	Maus	aufgereinigt durch Caprylsäure-Ammoniumsulfat-Präzipitation	Abiocode (Agoura Hills, CA, USA) (M1092-4a)
Anti-Tet3 (N1)	N-terminale Region von TET3	poly-klonal	Kaninchen	affinitätsgereinigt	Abiocode (Agoura Hills, CA, USA) (R1092-1)
Anti-Ywhag	rekombinantes Proteinfragment, das einer Region zwischen Aminosäurerest 1 und 179 von humanem 14-3-3 gamma entspricht	poly-klonal	Kaninchen	aufgereinigt durch Antigen-Affinitätschromatographie	Thermo Fisher (Rockford, IL, USA) (PA5-29690)
Anti-Ziege-IgG	Ziege-IgG	poly-klonal	Kaninchen	affinitätsgereinigt	Sigma/Aldrich /Fluka (Deisenhofen) (G4018)
Anti-Ziege-IgG	Ziege-IgG	poly-klonal	Kaninchen	affinitätsgereinigt	Sigma/Aldrich /Fluka (Deisenhofen) (A5420)
Cy2-Anti-Ziege	Ziege-IgG	poly-klonal	Esel	IgG-Antikörper wurden als intakte Moleküle durch Immunaффinitätschromatographie aus Antiserum aufgereinigt	Jackson Immuno-Research (West Grove, PA, USA) (705-225-147)
Cy3-Anti-Maus	Maus-IgG	poly-klonal	Esel	IgG-Antikörper wurden als intakte Moleküle durch Immunaффinitätschromatographie aus Antiserum aufgereinigt	Jackson Immuno-Research (West Grove, PA, USA) (715-165-151)

3. Material und Methoden

Cy3-Anti-Ziege	Ziege-IgG	polyklonal	Esel	IgG-Antikörper wurden als intakte Moleküle durch Immunaффinitätschromatographie aus Antiserum aufgereinigt	Jackson Immuno-Research (West Grove, PA, USA) (715-165-151)
----------------	-----------	------------	------	--	---

3.3. Geräte

Tabelle 3.2.: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Software	Firma
Bildgerät	LAS-3000	Image Reader LAS-3000	Fujifilm (Minato, Tokio, Japan)
Bildgerät	Tecan Genios Pro	XFLUOR4GENIOSPRO Version V 4.63	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN® Tetra		Bio-Rad (München)
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	Ultimate 3000	Dionex Chromatography MS Link 2.14 Build 3818 (basierend auf Chromeleon 6.80 SR13 Build 3818) und Thermo Xcalibur 3.0.63	Dionex/Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
HPLC	Agilent 1290 UHPLC-System	MassHunter 7.0	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Leica SP8	LAS AF	Leica (Wetzlar)
Konfokalmikroskop	Leica DMI4000B	LAS AF	Leica (Wetzlar)
Massenspektrometer	LTQ-Orbitrap XL	Thermo Xcalibur 3.0.63	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Massenspektrometer	MALDI-TOF Bruker Daltonics autoflex II	flexControl 3.0 (Build 185), flexAnalysis 3.0 (Build 96)	Bruker (Billerica, MA, USA)
Massenspektrometer	Agilent 6490 Triple-Quadrupol	MassHunter 7.0	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
PCR-Gerät	Mastercycler epgradient S realplex ⁴	Eppendorf CycleManager	Eppendorf (Hamburg)
Photometer	Eppendorf BioPhotometer Plus		Eppendorf (Hamburg)

Spektrophotometer	NanoDrop® ND-1000	NanoDrop 1000 3.8.1	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer Comfort		Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5424R		Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5810R		Eppendorf (Hamburg)

3.4. Biochemische Methoden

3.4.1. Zellkultur und Transfektion

3.4.1.1. Humane embryonale Nierenzellen (HEK293T-Zellen)

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293T-Zellen) (ATCC) wurden bei 37°C in einer H₂O-gesättigten und CO₂-angereicherten (5%) Atmosphäre kultiviert. Als Medium wurden *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (10% fötales Rinderserum (*fetal bovine serum*, FBS)) oder RPMI (10% FBS) verwendet. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 70 - 80% erreichten, wurden sie passagiert. Die Transfektion wurde in p150-Petrischalen durchgeführt. Hierzu wurden fünf Millionen Zellen in 20 mL Medium verwendet. Nach der Aussaat wurden die Zellen unter den bereits beschriebenen Bedingungen für 24 Stunden kultiviert, um eine Konfluenz von 40 - 80% zu erreichen. 10 µg DNA und 30 µl Transfektionsreagenz jetPRIME® (Polyplus Transfection) wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. Alle verwendeten Expressionsplasmide wurden bereits beschrieben.^[208] Um die Transkriptionsrate der transfizierten Zellen zu erhöhen, wurde vier Stunden nach der Transfektion das Medium abgenommen und mit Natriumbutyrat (4 mM Endkonzentration) versetztes Medium hinzugefügt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und sofort für die Präparation des Zellkernextrakts verwendet.

3.4.1.2. Murine embryonale Stammzellen (mESCs)

Die mESCs wurden unter FBS/2i-Bedingungen passagiert und für ein partielles *Priming* vier Tage ohne 2i, wie bereits beschrieben,^[118] kultiviert bevor Zellkernextrakte präpariert wurden. Verwendet wurden hierbei Wildtyp (WT) J1 mESCs und Tet TKO mESCs.^[389]

3.1.1.3. Neurale Vorläuferzellen (NPCs)

Die FGF-2/EGF-abhängige neurale Vorläuferzelllinie (NPC) ENC1 wurde wie bereits beschrieben kultiviert.^[208]

3.4.2. Zellkernextraktpräparation

Zellkernlysate von HEK293T-Zellen wurden wie bereits beschrieben präpariert.^[48] Das komplette Mausgehirn (*Mus musculus*, BL6J WT, weiblich, 110 Tage alt) wurde nach dem von Guillemín und Kollegen publizierten Protokoll lysiert.^[390] Das resultierende Zellkernextrakt wurde daraufhin mit 25 U Benzonase (Merck Millipore) für 30 Minuten auf Eis behandelt und anschließend für 15 Minuten bei 21 130 x g zentrifugiert. Der Überstand, der das Zellkernlysat enthält, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Ein Bradford-Test (Bio-Rad) wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, um die Proteinkonzentration zu bestimmen.

3.4.3. Western Blot

Zur Analyse der Proben mit einem *Western Blot*, wurden diese zusammen mit dem MagicMark XP Standard (ThermoFisher) auf ein 4 - 15% vorgefertigtes Polyacrylamidgel (Bio-Rad) geladen. Das Gel wurde bei konstanten 150 V für 70 Minuten laufen gelassen. Zum Blotten wurde eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)-*Blotting*-Membran (GE Healthcare) und gekühlter Towbin-*Blotting*-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0.038% (w/v) Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS)) verwendet. Die Membran wurde für 5 Minuten in absolutem Methanol aktiviert. Das Filterpapier wurde für 15 Minuten in Towbin-Puffer äquilibriert und das vorgefertigte Gel wurde, nachdem es gelaufen war, für 5 Minuten in Towbin-Puffer äquilibriert. Der *Western Blot* wurde bei 4°C für 11 Stunden mit konstanten 35 V durchgeführt. Anschließend wurde die PVDF-Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5% (w/v) Milchpulver in *Tris-buffered saline with Tween20* (TBS-T) (2 mM Tris/Cl pH = 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween-20) abgesättigt. Die primären Antikörper wurden 1:1000 mit 15 mL 5% (w/v) Milchpulver in TBS-T verdünnt. Nach dem Blockieren wurde die Membran in drei Teile geschnitten (Teil1: Proteine < 40 kDa; Teil2: Proteine > 40 kDa, aber < 120 kDa; Teil3: Proteine > 120 kDa). Die Blockiersuspension wurde entfernt und die verdünnten Primärantikörper hinzugefügt (Anti-GFP-Antikörper zu Teil1 und Teil3; Anti-Aco2-Antikörper oder Anti-Glud-Antikörper zu Teil2). Nach einer Inkubation von 11 Stunden bei 4°C wurden die Primärantikörper entfernt und die Membran wurde dreimal mit TBS-T gewaschen. HRP-konjugierte Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-IgG, Anti-Maus-IgG, Anti-Ziege-IgG (A5420)) wurden 1:10000 mit 5% (w/v) Milchpulver in TBS-T verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur hinzugefügt. Danach wurde die Membran zweimal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen. Zur Bildgebung wurde *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific) verwendet.

Wurde die endogene Co-IP mittels *Western Blot* analysiert, wurden dieselben Konditionen verwendet, jedoch wurde die Membran nicht zerschnitten. Um die Spezifität des Anti-Tet3-Antikörper (Abiocode R1092) zu testen, wurde die PVDF-Membran mit dem Anti-Tet3-Antikörper inkubiert. Um die Tet3-Glud-Interaktion zu analysieren, wurde die PVDF-Membran mit dem Anti-Glud-Antikörper inkubiert; um die Tet3-Aco2-Interaktion zu analysieren, wurde die PVDF-Membran mit dem Anti-Aco2-Antikörper inkubiert.

3.4.4. Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie (IHC) wurden 12 µm dicke coronare Cryo-Sektionen von schockgefrorenen adulten Mäusegehirnen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0.1 M phosphatgepufferter Lösung, pH 7.4 (0.1 M PB) auf Objektträgern fixiert. Nach dreimaligen Waschen mit 40 µL 0.1 M PB, wurden die Schnitte über Nacht mit Primärantikörperlösung bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Hierbei wurden Anti-Tet3-Antikörper (Abiocode R1092), Anti-Glud-Antikörper und Anti-Aco2-Antikörper als Primärantikörper verwendet. Die Primärantikörper wurden mit 0.1 M PB, der 5% (v/v) Blockierreagenz (Chemiblocker, CB, Millipore) und 0.3% (v/v) Triton-X-Lösung enthielt, verdünnt. Der Negativkontrolle wurden keine Primärantikörper hinzugefügt. Zur Detektion wurden Alexa488-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:800), Cy2-Anti-Ziege-Antikörper (1:200) und Cy3-Anti-Maus-Antikörper (1:400) mit 3% (v/v) CB enthaltendem 0.1 M PB verdünnt. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (5 µg/mL) gefärbt, welches für 5 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur hinzugefügt wurde. Nach dem Eindeckeln mit Hilfe von *Mounting-Medium* (Mountant Permafluor, Thermo Scientific), wurden die Schnitte mit einem Leica SP8 konfokalen Laser-*Scanning-Mikroskop* (Leica, Wetzlar) analysiert. Die IHC-Experimente wurden in zwei biologischen Replikaten durchgeführt.

3.4.5. Immuncytochemie

Für die Immuncytochemie (ICC) wurden pro *Well* einer µ-Platte (ibidi) 30 000 – 70 000 mESCs oder ENC1-Zellen, die drei Tage ohne 2i kultiviert wurden, ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf Deckgläsern fixiert, indem 4% (v/v) PFA in 0.1 M phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) mit 0.5 mM MgCl₂ und 0.9 mM CaCl₂, pH 7.4 (0.1 M PBS) hinzugegeben und für 10 Minuten inkubiert wurde. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit 0.1 M PBS gewaschen, bevor sie mittels 0.3% (v/v) TritonX in 0.1 M PBS permeabilisiert wurden. Danach wurden die Zellen

erneut dreimal gewaschen und mit 0.1 M PBS zusammen mit 5% Blockierreagenz (Chemiblocker, CB, Millipore) für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Primärantikörper hinzugefügt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Als Primärantikörper wurden Anti-Tet3-Antikörper (Abiocode M1092-3), Anti-Tet1-Antikörper und Anti-H3K9me3-Antikörper für die ICC mit Chromatinmarkern verwendet. Anti-Tet3-Antikörper (Abiocode M1092-4a), Anti-Ppp1cc-Antikörper, Anti-Tet1-Antikörper und Anti-Ywhag-Antikörper wurden als Primärantikörper zur Validierung der identifizierten Tet-Interaktionspartner in mESCs verwendet. Zur Bestätigung der entdeckten Tet-Interaktoren in ENC1 wurden Anti-Tet3-Antikörper (Sigma HPA05084S) und Anti-Supt16-Antikörper als Primärantikörper verwendet. Die Primärantikörper wurden in 0.1 M PBS mit 5% (v/v) Blockierreagenz und 0.3% (v/v) TritonX-Lösung verdünnt (Anti-Tet3 (M1092-3) 1:500, Anti-Tet1 1:300, Anti-H3K9me3 1:500, Anti-Tet3 (M1092-4a) 1:2000, Anti-Ppp1cc 1:100, Anti-Tet1 1:50, Anti-Ywhag 1:100, Anti-Tet3 (HPA05084S) 1:100, Anti-Supt16 1:200). Zur Negativkontrolle wurden keine Primärantikörper hinzugefügt. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit 0.1 M PBS gewaschen. Zur Detektion wurden Alexa488-Anti-Ratte (1:600), Alexa488-Anti-Maus (1:600), Alexa555-Anti-Kaninchen (1:600), Alexa555-Anti-Ratte (1:600), Alexa555-Anti-Maus (1:600) und Cy3-Anti-Ziege (1:400) als Sekundärantikörper verwendet und in 0.1 M PBS mit 3% (v/v) CB verdünnt. Die Sekundärantikörper wurden auf die Zellen gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (5 µg/mL) gefärbt, indem es für 5 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur hinzugefügt und inkubiert wurde. Nach dem Eindeckeln mit Hilfe von *Mounting-Medium* (Mountant Permafluor, Thermo Scientific), wurden die Schnitte mit einem Leica SP8 konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica, Wetzlar) analysiert. Ausgewertet wurde die Colokalisation mit ImageJ 2.0.0, *Colocalization Threshold*. Die ICC-Experimente wurden in zwei biologischen Replikaten durchgeführt.

3.4.6. Proximity Ligation Assay (PLA)

Der *Proximity Ligation Assay* (PLA) wurde wie in Folge beschrieben mit einem *Duolink InSitu Orange Starter Kit* (Sigma) mit leichten Änderungen durchgeführt.^[265]

3.4.6.1. PLA mit kultivierten Zellen

Jeweils 30 000 mESCs, die zwei Tage ohne 2i kultiviert wurden, wurden pro *Well* einer μ -Platte (ibidi) ausgesät. Die Zellen wurden entweder mit grün fluoreszierendem Protein (*green fluorescent protein*, GFP) als Kontrolle oder mit GFP-Tet3 transfiziert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und sofort 200 μ L Waschpuffer A (PBS, 0.9 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 , 0.02% (v/v) Tween-20) zugegeben, damit die Zellen nicht austrocknen. Die Zellen wurden daraufhin zweimal mit 200 μ L Waschpuffer A gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 200 μ L 3.7% (v/v) Paraformaldehyd in Waschpuffer B (PBS, 0.9 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2) inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung entfernt und die Zellen wurden zweimal mit 200 μ L Waschpuffer A gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 200 μ L Blockierlösung (3% (w/v) BSA in Waschpuffer B) inkubiert. Währenddessen wurden die Antikörperlösungen hergestellt. Dazu wurden 1 μ L Anti-PP1-gamma-Antikörper und 1 μ L GFP-Antikörper jeweils in 100 μ L Antikörperverdünnungsmittel (*antibody diluent*, Sigma) gelöst. Nach Entfernung der Blockierlösung, wurden die Zellen mit der Antikörperlösung über Nacht bei 4°C in einer feuchten Atmosphäre inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Zellen wurden zweimal mit 200 μ L Waschpuffer A gewaschen. Für die PLA-Probenlösung wurden 10 μ L PLA-Probe (+) Anti-Kaninchen (Sigma), 10 μ L PLA-Probe (-) Anti-Maus (Sigma) und 30 μ L Antikörperverdünnungsmittel vermischt und hinzugefügt. Die Zellen wurden in einer vorgewärmten Feuchtkammer für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die PLA-Probenlösung entfernt und die Zellen wurden zweimal mit Waschpuffer A gewaschen. 50 μ L Ligationslösung wurden zugegeben, welche zuvor durch Mischen von 1.0 μ L 1 U/ μ L Ligase, 10 μ L Ligationsvorratslösung (alle von Sigma) und 29 μ L bidest. H_2O hergestellt wurde. Nach einer Inkubation von 30 Minuten in einer vorgewärmten Feuchtkammer bei 37°C, wurde die Ligationslösung entfernt und die Schnitte wurden zweimal mit 100 μ L Waschpuffer A gewaschen. Für die Amplifikationsreaktion wurden 0.5 μ L Polymerase 10 U/ μ L, 10 μ L Amplifikationsvorratslösung (alle von Sigma) und 39.5 μ L bidest. H_2O gemischt und hinzugefügt. Die Zellen wurden für 100 Minuten bei 37°C in einer vorgewärmten Feuchtkammer inkubiert, bevor die Amplifikationslösung entfernt wurde. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer B (Sigma) und einmal mit 0.01% Waschpuffer B gewaschen. Zuletzt wurde 100 μ L Waschpuffer B zugegeben und die Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI4000B, Filter I3 für GFP, Filter N2.1 für PLA-Amplifikationsprodukt) analysiert.

3.4.6.2. PLA mit histologischen Schnitten

Die histologischen Schnitte von erwachsenen Mäusegehirnen wurden, wie bereits in der IHC beschrieben, rehydriert und fixiert. Bevor die Primärantikörper hinzugefügt wurden, wurden die Schnitte mit 10% CB blockiert. Anti-Tet3-, Anti-Glud- und Anti-Aco2-Antikörper wurden, wie bereits bei der IHC beschrieben, verdünnt. Der Anti-Got2-Antikörper wurde 1:200 in 0.1 M PB enthaltendem 5% CB und 0.3% Triton-X 100 verdünnt. Die Primärantikörper wurden über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer hinzugefügt und inkubiert. Der Negativkontrolle wurden keine Primärantikörper hinzugefügt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimal mit Waschpuffer A (Sigma) gewaschen. Für die PLA-Probenlösung wurden 10 µL PLA-Probe (+) Anti-Kaninchen (Sigma), 10 µL PLA-Probe (-) Anti-Maus (Sigma) (für Anti-Aco2 und Anti-Got2) oder 10 µL PLA-Probe (-) Anti-Ziege (Sigma) (für Anti-Glud) und 30 µL Antikörperverdünnungsmittel (*antibody diluent*) vermischt und hinzugefügt. Die Schnitte wurden in einer vorgewärmten Feuchtkammer für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte zweimal mit Waschpuffer A und der Ligationslösung, welche zuvor durch Mischen von 1.0 µL 1 U/µL Ligase, 10 µL Ligationsvorratslösung (alle von Sigma) und 29 µL bidest. H₂O hergestellt wurde, gewaschen. Nach einer Inkubation von 30 Minuten in einer vorgewärmten Feuchtkammer bei 37°C, wurde die Ligationslösung entfernt und die Schnitte wurden zweimal mit 100 µL Waschpuffer A gewaschen. Für die Amplifikationsreaktion wurden 0.5 µL Polymerase 10 U/µL, 10 µL Amplifikationsvorratslösung (alle von Sigma) und 39.5 µL bidest. H₂O gemischt und hinzugefügt. Die Schnitte wurden für 100 Minuten bei 37°C in einer vorgewärmten Feuchtkammer inkubiert und anschließend zweimal mit Waschpuffer B (Sigma), einmal mit 0.01% Waschpuffer B und einmal mit 0.1 M PB gewaschen. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt. Nach dem Eindeckeln mit Hilfe von *Mounting-Medium* (Mountant Permafluor, Thermo Scientific), wurden die Schnitte mit einem Leica SP8 konfokalen Laser-*Scanning*-Mikroskop (Leica, Wetzlar) analysiert.

3.4.7. RNA-Isolation

RNA aus mESC und ENC-1 wurde mittels *peqGold Total RNA Kit* (peqLab) nach den Herstellerangaben isoliert.

3.4.8. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Vor der RT-qPCR wurde 1 µg RNA in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) mit Hilfe des *iScript cDNA Synthesis Kit* (BioRad) nach Angaben des Herstellers transkribiert. Die finale cDNA-Konzentration lag bei 50 ng/µL. Für die RT-qPCR wurde die cDNA auf 25 ng/µL mit Nuklease-freiem bidest. H₂O verdünnt. Pro 2 µL der cDNA-Verdünnung wurden 10 µL *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (BioRad) hinzugefügt. Für jedes *Primer*paar wurden der Vorwärts- und Rückwärts-*Primer* in gleichen Mengen gemischt und mit Nuklease-freiem bidest. H₂O auf eine finale Konzentration von 1.25 µM verdünnt. 12 µL cDNA/iTaq-Mastermix und 8 µL *Primer*-Mix wurden pro *Well* hinzugefügt. 96-*Well*-PCR-Platten (Axygen Scientific) wurden in Kombination mit *Flat 8 Cap Strips* verwendet. Mit Hilfe einer Eppendorf Zentrifuge 5810 R wurden die Proben bei 2000 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Jede Probe wurde in Triplikaten mit einem Eppendorf Mastercycler Realplex4 und den folgenden PCR-Einstellungen gemessen:

Schritt 1: 95°C für 2 Minuten

Schritt 2: 95°C für 15 Minuten	}	Schritt 2-4 wurden 40x wiederholt
Schritt 3: 55°C für 15 Minuten		
Schritt 4: 72°C für 20 Minuten		

Die folgenden *Primer* wurden für die RT-qPCR verwendet:

Tet1 Vorwärts-*Primer*: 5' CCA GGA AGA GGC GAC TAC GTT 3'

Tet1 Rückwärts-*Primer*: 5' TTA GTG TTG TGT GAA CCT GAT TTA TTG T 3'

Tet2 Vorwärts-*Primer*: 5' ACT TCT CTG CTC ATT CCC ACA GA 3'

Tet2 Rückwärts-*Primer*: 5' TTA GCT CCG ACT TCT CGA TTG TC 3'

Tet3 (alle) Vorwärts-*Primer*: 5' GAG CAC GCC AGA GAA GAT CAA 3'

Tet3 (alle) Rückwärts-*Primer*: 5' CAG GCT TTG CTG GGA CAA TC 3'

3.4.9. In-vivo-Isocitrat-Experiment

Das Experiment wurde in drei biologischen Replikaten und jeweils technischen Triplikaten durchgeführt. 6-*well*-Platten wurden mit 0.2% Gelatine überzogen und pro *well* $3 \cdot 10^5$ HEK293T-Zellen ausgesät. 24 Stunden nach dem Aussäen wurden die Zellen mit 600 ng Vektor-DNA transfiziert, die GFP-Tet3 (Volllängenkonstrukt) kodiert. 4 Stunden nach der Transfektion wurde das

Medium gewechselt und 10 mM Isocitrat (DL-Isocitronensäure-Trinatriumsalz, Sigma-Aldrich) zum frischen Medium hinzugefügt. 24 Stunden nach der Transfektion wurde wieder das Medium gewechselt und 10 mM Isocitrat hinzugefügt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die genomische DNA isoliert und anschließend die Analyse der mC-, hmC-, fC- und caC-Level wie bereits beschrieben durchgeführt.^[118] Für die statistische Analyse wurde GraphPad Prism 7.0 genutzt. Die Proben wurden auf Normalverteilung getestet (D'Agostino-Pearson-Test) und ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt (n = 9). Die Varianz wurde durch die Standardabweichung ermittelt, welche Ähnlichkeit zwischen den Gruppen zeigt.

3.4.10. *In-vitro*-Tet-Aktivitätstest

Für den Aktivitätstest wurden etwa 10 Millionen HEK293T-Zellen verwendet, welche mit dem zu untersuchenden Tet-Konstrukt transfiziert wurden (Tet3-Volllängenkonstrukt oder katalytische Domäne von Tet1 (Tet1CD) oder Tet3 (Tet3CD)). Anschließend wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert und mit 5 mL RIPA-Puffer (Chromotek), der mit 250 U Benzonase (Merck Millipore) und Proteaseinhibitor (Roche) ergänzt wurde, lysiert. Nach einer Inkubation für 30 Minuten auf Eis, wurde die Suspension bei 10 000 x g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der resultierende Überstand enthielt nukleäre und cytoplasmatische Proteine. Pro Aktivitätstest wurden 100 µL Anti-GFP-Partikel (Chromotek) dreimal mit Waschpuffer (10 mM Tris/Cl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5 mM EDTA) gewaschen und für eine Stunde bei 4°C mit dem Überstand inkubiert. Die GFP-Tet3CD-beladenen Partikel wurden anschließend mit GFP-Waschpuffer (Chromotek) gewaschen. Für den zweiten Waschschriff wurde der GFP-Waschpuffer mit 2 mM ZnSO₄ und 10 µL Nuclease S1 ergänzt. Die Partikel wurden mit diesem Puffer für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Ein weiterer Waschschriff mit 1 M NaCl-Lösung, die 10 mM HEPES, pH 7.5 enthielt, und zwei Waschschriffe mit GFP-Waschpuffer folgten. Die Partikel wurden bei 2 500 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Danach wurden die Partikel in vier Reaktionsgefäße verteilt und Reaktionspuffer (50 mM HEPES pH = 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM Vitamin C, 1.2 mM ATP, 2.5 mM DTT, 0.1 mM Fe^(III)(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6 · H₂O) hinzugefügt. Zu Probe 1 wurde 1 mM α-Ketoglutarat (Na⁺-Salz) hinzugefügt; zu Probe 2 wurde 1 mM Oxaloacetat zugegeben und zu Probe 3 wurde 1 mM α-Ketoglutarat hinzugefügt. Zu Probe 4 wurde kein mögliches Cosubstrat hinzugegeben. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine Probe ohne Tet und ohne Cosubstrat angesetzt (Probe 6). 1 000 pmol eines Oligonukleotids (5' - UUU UG**mC** GGU UG 3') wurden hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde daraufhin für 1.5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Zentrifugation mit 21 130 x g, wurde der

Überstand mit Hilfe einer Entsalzungsmembran entsalzt und mittels MALDI-TOF analysiert. Der *in-vitro*-Aktivitätstest wurde fünfmal durchgeführt, wobei dieselben Ergebnisse geliefert wurden.

3.4.11. *In-vitro*-Aktivitätstest mit Inhibitoren

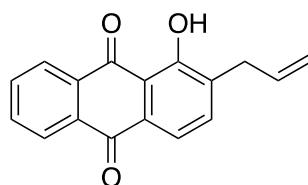
Die Proben wurden, wie bereits für den *In-vitro*-Aktivitätstest beschrieben, vorbereitet. Jedoch wurden 2000 pmol statt 1000 pmol Oligo eingesetzt und die Proben wurden für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Zu jeder Probe wurde 1 mM α -Ketoglutarat hinzugefügt. Zur Positivkontrolle wurden weder Oxaloacetat, noch Isocitrat dazugegeben. Um das inhibitorische Potential zu testen, wurden 10 mM und 100 mM Oxaloacetat oder Isocitrat hinzugefügt. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 5000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde für die MALDI-TOF-Analyse verwendet. Um das Verhältnis von mC-enhaltendem Oligo (Substrat) zu hmC/fC-enhaltendem Oligo (Produkt) zu berechnen, wurde die OriginPro 2016G 64-bit Software verwendet. *Peaks* des mC-enhaltenden Oligo (3294.5 Da) wurden im Bereich m/z 3290 – 3300 und *Peaks* des hmC/fC-enhaltenden Oligo (3310 Da) wurden im Bereich m/z 3305 – 3312 integriert. Der *in-vitro*-Aktivitätstest mit Inhibitoren wurde zweimal durchgeführt und lieferte das gleiche Ergebnis.

3.4.12. Co-Expression von Tet3 und Glud1 in HEK293T-Zellen

Das Experiment wurde in drei biologischen Replikaten durchgeführt. $3 \cdot 10^5$ HEK293T-Zellen wurden pro *Well* in eine 6-*Well*-Platte ausgesät. 24 Stunden danach wurden die Zellen mit 2.0 μ g Vektor-DNA transfiziert, die GFP-Tet3 (Volllängenkonstrukt oder katalytische Domäne) kodiert. Für die Co-Transfektion wurde zusätzlich 2.0 μ g Glud1-kodierende Vektor-DNA transfiziert. Vier Stunden danach wurde das Medium gewechselt und 36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Die GFP-Tet3-Level wurden mit Hilfe eines Geräts zur Durchflusszytometrie bestimmt (BD FACS Cantor II, BD Biosciences, USA; *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) Parameter FSC 132 V, SSC 407 V, GFP 308 V). Anschließend wurde die genomische DNA isoliert und die mC-, hmC-, fC- and caC-Level wurden in technischen Triplikaten wie bereits beschrieben analysiert.^[118] Level an 8-Oxo-7,8-Dihydroguanin (8-oxoG) wurden ebenfalls analysiert, um nachzuweisen, dass zufällige Oxidationsprozesse die Ergebnisse nicht beeinträchtigten. 5 μ g genomischer DNA wurden für jedes technische Replikat analysiert. Level an hmC und fC der Tet3-Glud co-transfizierten Zellen wurden auf die Tet3-Level der, nur mit Tet3-transfizierten, Zellen normalisiert. Für die statistische Analyse wurde GraphPad Prism 7.0 genutzt. Die Proben, inklusive biologischer und technischer Replikate, wurden

auf Normalverteilung getestet (D'Agostino-Pearson-Test) und ein ungepaarter t-Test durchgeführt (nur biologische Replikate (Mittelwerte der technischen Replikate), $n = 3$ für jede Bedingung). Die Varianz wurde durch die Standardabweichung ermittelt, welche Ähnlichkeit zwischen den Gruppen zeigt. Wenn R162 verwendet wurde (zwei biologische Replikate), wurde es in einer Konzentration von 20 μM vier Stunden nach der Transfektion zugegeben.

3.4.13. Synthese des Glud1-Inhibitors R162



Die Synthese des Inhibitors R162 wurde nach Literaturangaben von René Rahimoff durchgeführt.^[391-392] Das Molekül wurde vor der Verwendung in der Zellkultur mittels präparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) aufgereinigt (Nucleosil VP 250/10 C18-Säule von Macherey Nagel, 100% Acetonitril für 10 Minuten).

3.4.14. Depolarisierung der Neuronen des Hippocampus

Die Experimente zur Depolarisierung der Neuronen des Hippocampus wurden in Kollaboration mit Dr. Stylianos Michalakis' Arbeitsgruppe durchgeführt. Für die Studien wurden 4 – 5 Wochen alte C57BL6/J-Wildtyp-Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Alle Experimente mit Tieren richteten sich nach dem deutschen Tierschutzgesetz und wurden durch die lokale Behörde genehmigt (Regierung von Oberbayern).

Die Mäuse ($n = 3$) wurden durch einen Genickbruch getötet. 400 μm dicke, transversale histologische Schnitte des Hippocampus wurden wie bereits beschrieben angefertigt.^[393-394] Im Allgemeinen wurde hierzu das Gehirn entfernt und die Hippocampi jeder Hemisphäre wurden seziert und mit einem MX-TS Gewebeschnneider (Siskiyou Cooperation, OR) geschnitten. Die Schnitte wurden in einer mit Sauerstoff angereicherten (95% O_2 , 5% CO_2), physiologischen Lösung (118 mM NaCl, 3 mM Kaliumchlorid (KCl), 1 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4), 25 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), 10 mM Glucose, 1.5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0.1% Dimethylsulfoxid (DMSO)) bei 37°C gesammelt bis die Hippocampi aller drei Replikate geschnitten

waren. Anschließend wurden die Schnitte drei verschiedenen Bedingungen zugeteilt: mit Sauerstoff angereicherte, physiologische Lösung, mit Sauerstoff angereicherte 25 mM KCl-Lösung (118 mM NaCl, 25 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM Glucose, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.1% DMSO) und mit Sauerstoff angereicherte und mit Inhibitor R162 ergänzte 25 mM KCl-Lösung (118 mM NaCl, 25 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM Glucose, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 µM R162, 0.1% DMSO). 6 – 10 Schnitte wurden für jedes Replikat zusammengefasst. Nach sechs Stunden Inkubationszeit, wurden die Schnitte in Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff gefriergetrocknet und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Die Isolierung der DNA und anschließende Analyse der mC- und hmC-Level wurde wie bereits beschrieben durchgeführt.^[32, 116] Level an 8-Oxo-7,8-Dihydroguanin (8-oxoG) wurden analysiert, um zu zeigen, dass zufällige Oxidationsvorgänge nicht die Ergebnisse beeinträchtigen. Messungen wurden, abhängig von der Menge der isolierten, genomischen DNA, in technischen Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Pro Replikat wurde 1 µg genomischer DNA analysiert.

Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism 7.0 durchgeführt. Ein Ausreißer in den technischen Replikaten wurde von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Maus 3 unter physiologischen Bedingungen, 0.00147 hmC/dN, insgesamt drei technische Replikate). Unter der Annahme einer Normalverteilung der hmC-Werte in der Hippocampus-Region der Maus, zeigte eine einseitige Varianzanalyse (*analysis of variation*, ANOVA), dass sich die Mittelwerte signifikant zwischen den verschiedenen Bedingungen unterscheiden: Anzahl der Werte insgesamt = 9, p-Wert = 0.0224. Für die statistische Analyse wurden nur biologische Replikate (Mittelwerte der technischen Replikate) berücksichtigt.

3.4.15. Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

3.4.15.1. GFP-Tet-gesättigte Co-IP

20 µl Anti-GFP-Partikel (GFP-Trap[®]_M, Chromotek) wurden dreimal mit Waschpuffer (10 mM Tris/Cl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5 mM EDTA) gewaschen und anschließend für 15 Minuten auf Eis mit dem Zellkernextrakt von GFP-Tet-überexprimierenden HEK293T-Zellen inkubiert. Um die Sättigung der Partikel mit dem GFP-Fusionskonstrukt sicherzustellen, wurden unterschiedliche Mengen Lysat getestet und mit einem Fluoreszenzlesegerät (Genios Pro, Tecan) überprüft. Die mit GFP-Tet beladenen Partikel wurden anschließend zweimal mit einer 10 mM HEPES (pH 7.5) enthaltenden 150 mM NaCl-Lösung gewaschen. Zwei weitere Waschschrte mit einer 10 mM HEPES (pH 7.5)

enthaltenden 1 M NaCl-Lösung und zwei Waschschr tte mit Lysepuffer C (20 mM HEPES pH 7.5, 420 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerin) folgten. Danach wurden die gesättigten GFP-Tet-Partikel mit 200 µg nukleärem Extrakt für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Um die gebundenen Proteine zu eluieren, wurde 50 µl 200 mM Glycin pH 2.5 hinzugefügt und die Lösung 30 Sekunden lang geschüttelt. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde der Elutionsschritt wiederholt.

3.4.15.2. Endogene Co-IP

Wurde die endogene Co-IP für die massenspektrometrische Analyse durchgeführt, wurden 250 µg nukleäres Gehirnextrakt, 1 µg Antikörper und 10 µl Dynabeads Protein G (ThermoFisher) pro Replikat verwendet. Als Antikörper wurden der Anti-Tet3-Antikörper (Abiocode R1092-1) oder der Anti-Ziege-IgG-Antikörper als Negativkontrolle genutzt. Wurde ein *Western Blot* an die endogene Co-IP angeschlossen, so wurde der Ansatz für die massenspektrometrische Analyse vervierfacht. Die nukleären Gehirnextrakte wurden zusammen mit dem Antikörper für eine Stunde bei 4°C auf einem Rotierger t inkubiert. Die Dynabeads Protein G wurden dreimal mit Waschpuffer (10 mM Tris/Cl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5 mM EDTA) gewaschen und zum Lysat hinzugefügt. Die Partikel wurden 30 Minuten bei 4°C auf einem Rotator inkubiert und anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Schlussendlich wurde mit 30 µl 1% (v/v) Ameisensäure für 15 Minuten bei Raumtemperatur zur massenspektrometrischen Analyse eluiert. Für die *Western Blot* Analyse wurden die Proben stattdessen mit 50 µl SDS-Ladepuffer (50 mM Tris p 6.8, 100 mM DTT, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerol, 0.1% (w/v) Bromphenolblau) für 10 Minuten bei 70°C eluiert.

3.4.15.3. Reverse Co-IP

Die reverse Co-IP wurde mit Anti-FACT/Supt16H-Antikörpern, Anti-PP1-gamma-Antikörpern und Anti-Ziege-IgG-Antikörpern, die als Negativkontrolle verwendet wurden, durchgeführt. Für jede reverse Co-IP wurden 10 µL Dynabeads Protein G (Life Technologies) dreimal mit 500 µL Waschpuffer 3 (PBS, 0.5 % (w/v) Octyl- -D-glucopyranosid) gewaschen, bevor 1 µg Antikörper zugegeben wurde. Die Antikörper wurden in 50 µL Waschpuffer 3 gelöst, zu den Partikeln gegeben und für eine Stunde in einem Rotator bei Raumtemperatur gemischt. Anschließend wurden die ungebundenen Antikörper entfernt und die Partikel mit den gebundenen Antikörpern zweimal mit 500 µL Waschpuffer 3 gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 250 µg Zellkernlysate aus NPCs

eingesetzt, wenn Anti-FACT/Supt16H-Antikörper verwendet wurden. Falls Anti-PP1-gamma-Antikörper oder Anti-Ziege-IgG-Antikörper verwendet wurden, wurde 250 µg Zellkernlysate aus mESCs eingesetzt. Das Lysat wurde mit Lysepuffer C (20 mM HEPES pH = 7.5, 420 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerol) auf ein Volumen von 400 µL aufgefüllt, vorsichtig gemischt und zu den Partikeln gegeben. Die Suspension wurde für eine Stunde in einem Rotator bei Raumtemperatur inkubiert. Um ungebundene und unspezifisch gebundene Proteine nach der Inkubation zu entfernen, wurde der Überstand verworfen und die Partikel zweimal mit 500 µL Waschpuffer 1 (10 mM HEPES pH = 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA), zweimal mit 500 µL Waschpuffer 2 (10 mM HEPES pH = 7.5, 1 M NaCl, 0.5 mM EDTA) und zweimal mit 500 µL Waschpuffer 3 gewaschen. Anschließend wurden 250 µg Zellkernlysate aus GFP-Tet3-transfizierten HEK293T-Zellen, welche nicht mit Buttersäure behandelt wurden, mit Lysepuffer C auf ein Volumen von 400 µL aufgefüllt, vorsichtig gemischt und zu den Partikeln gegeben. Die Suspension wurde für zwei Stunden in einem Rotator bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Überstand entfernt und die Partikel dreimal mit 500 µL Waschpuffer 3 gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch Zugabe von 30 µL 1% (v/v) Ameisensäure und anschließender Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einem Thermoschüttler bei 700 rpm (Umdrehungen pro Minute, *revolutions per minute*) eluiert. Das Eluat wurde gesammelt und der pH durch Zugabe von 10 µL 1 M Tris neutralisiert. Anschließend wurden die Proben für die Analyse mittels Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) vorbereitet.

3.5. Massenspektrometrie

3.5.1. Massenspektrometrische Analyse der Co-Immunpräzipitationsproben

Proben zur massenspektrometrischen Analyse wurden durch Zugabe von 100 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) reduziert. Dazu wurden sie für eine Stunde bei 60°C mit 650 rpm in einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben alkyliert, indem 200 mM Iodacetamid zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert wurde. Die Proben wurden daraufhin mit 0.5 µg Trypsin (Promega) bei 37°C für 16 Stunden verdaut. Danach wurden sie für 5 Minuten bei 100°C inkubiert, um jegliche Enzyme zu inaktivieren. Anschließend wurde 1 mM des Proteaseinhibitors Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF) zugegeben. Zum Schluss wurden die Proben mit Hilfe von Stage Tips aufgereinigt.^[395]

Analysiert wurden die Proben auf einem UltiMate 3000 Nano-LC-System (Dionex, Fisher Scientific), gekoppelt mit einer LTQ-Orbitrap XL (Fisher Scientific). Sie wurden auf einer µ-Vorsäule (PepMap100, C18, 5 µM, 100 Å, Größe 300 µm i.d. x 5 mm) entsalzt und aufkonzentriert. Weiter prozessiert wurden die Proben auf einer maßgefertigten analytischen Säule (ReproSil-Pur, C18, 3 µM, 120 Å, gepackt in einen 75 µm i.d. x 150 mm und 8 µm Picotip Emitter).

Die Proben wurden mit einer 127 Minuten langen, mehrstufigen, analytischen Trennung bei einer Flussrate von 300 nl/min analysiert. Hierbei wurden nur Lösungsmittel in LC-MS-Qualität verwendet (Lösungsmittel A: Wasser + 0.1% Ameisensäure; Lösungsmittel B: Acetonitril + 0.1% Ameisensäure). Der Gradient mit Anteilen an Lösungsmittel B in Prozent wurde wie folgt programmiert:

1% für 1 Minute; 1% - 4% über 1 Minute; 4% - 24% über 100 Minuten; 24% - 60% über 8 Minuten; 60% - 85% über 2 Minuten; 85% für 5 Minuten; 85% - 1% über 2 Minuten; 1% für 8 Minuten

Die massenspektrometrische Analyse wurde mit einem kompletten Massenscan (*full mass scan*) im Massenbereich zwischen 300 und 1700 m/z bei einer Auflösung von 60 000 durchgeführt. Nach diesem Überblicksscan wurden fünf Scans mit dem Ionenfallen-Massenanalysator bei einer normalen Auflösungseinstellung und Breitband-CID-Fragmentierung mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 35 ausgeführt. Signale mit einem unerkannten Ladungszustand oder einem Ladungszustand von 1 wurden nicht für die Fragmentierung ausgewählt. Um das *Supersampling* von Peptiden zu vermeiden, wurde eine dynamische Ausschlussliste implementiert. Ein Peptid wurde dadurch für 90 Sekunden von der Selektion und Fragmentierung ausgeschlossen, wenn es zweimal innerhalb von 30 Sekunden gemessen wurde.

3.5.2. Massenspektrometrische Datenauswertung

Die Software MaxQuant (Version 1.5.0.25) wurde für die massenspektrometrische Datenprozessierung verwendet. Die Andromeda-Suchmaschine wurde in Kombination mit der UniProt-Datenbank (*Mus musculus*) genutzt. Ein Maximum von zwei verpassten Schnittstellen wurde erlaubt. Die *main search peptide tolerance* wurde auf 4.5 ppm gesetzt. Carbamidomethyl (C) wurde als statische Modifikation gewählt. Als variable Modifikationen wurden Acetyl (Protein N-Terminus) und Oxidation (M) ausgewählt. Die minimale Peptidlänge wurde auf 7 eingestellt.

3.5.3. LFQ-Datenauswertung

Zur Quantifizierung wurde die massenspektrometrische Datenauswertung zusammen mit der LFQ-Option in MaxQuant (Version 1.5.0.25) genutzt.^[376] Die Quantifizierung der GFP-Tet3-gesättigten Co-IP wurde mit vier biologischen Replikaten durchgeführt. GFP alleine diente als Kontrolle. Drei biologische Replikate wurden für die endogene Co-IP verwendet. Hier diente die Co-IP mit dem Anti-Ziege-IgG-Antikörper als Kontrolle. Der LFQ-Algorithmus wurde mit den Standardeinstellungen verwendet (LFQ minimales Verhältnis (*ratio count*): 2, *Fast LFQ*, LFQ minimale Anzahl an Nachbarn: 3, LFQ durchschnittliche Anzahl an Nachbarn: 6). Außerdem wurde die Option „*match between runs*“ eingestellt.

LFQ-Daten wurden mit der Perseus Software (Version 1.5.0.9) analysiert. Die LFQ-Intensitäten wurden log-transformiert und nur solche Proteine wurden beibehalten, die in mindestens drei Proben identifiziert wurden. Da eine der GFP-Kontrollen der gesättigten Co-IP im Gehirn nur 64 Proteine statt wie üblich mehr als 400 enthielt, wurde dieses Replikat aus dem Datensatz entfernt. Genontologie(GO)-Analysen wurden mit der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID Bioinformatics Resources 6.7) durchgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Veröffentlichungen

4.1.1. Der funktionelle Kontext von Tet1 und Tet3 im Eu- und Heterochromatin

Die Frage, warum Wirbeltiere unterschiedliche Tet-Enzyme brauchen, um die Oxidation von mC zu hmC, fC und caC durchzuführen, ist bisher ungeklärt. Um die funktionellen Rollen von Tet1 und der beiden Tet3-Isoformen Tet3 und Tet3^{-CXXC} aufzuklären, wurden die Interaktome dieser Enzyme mittels Affinitätsproteomik-Studien analysiert.

4.1.1.1. Entwicklung einer GFP-Tet-gesättigten Co-IP zur Identifikation des Tet-Interaktoms

Um einen direkten Vergleich zwischen verschiedenen Zelltypen zu ermöglichen, wurde eine Tet-gesättigte Co-IP-Methode entwickelt. Der schematische Ablauf dieser Methode ist in Abbildung 4.1 illustriert. Die Methode basiert auf der Generierung und Verwendung von Partikeln, die mit dem jeweiligen Zielprotein beladen sind.

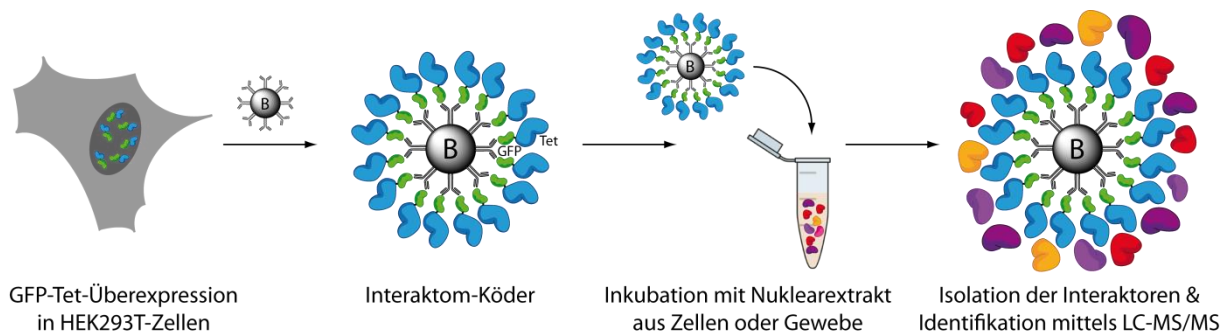


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der GFP-Tet-gesättigten Co-Immunpräzipitation. Das mit GFP fusionierte Protein von Interesse wird zuerst in HEK293T-Zellen produziert und anschließend mit Hilfe von magnetischen Partikeln mit Anti-GFP-Nanobodies isoliert. Die auf diese Weise mit dem Zielprotein gesättigten Partikel dienen als Interaktom-Köder, wenn sie mit Zellkernextrakt aus Gewebe oder Zellen von Interesse inkubiert werden. Nach Isolation der Interaktoren, können diese mittels Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) identifiziert werden. B = Anti-GFP magnetische Partikel

Um solche Partikel herzustellen, wurden die jeweiligen Tet-Proteine zuerst als N-terminale GFP-Fusionskonstrukte (GFP-Tet1, GFP-Tet3, GFP-Tet3^{-CXXC}) in HEK293T-Zellen überexprimiert. Anschließend wurden die GFP-Tet-Fusionsproteine auf magnetischen Partikeln mit Anti-GFP-

Nanobodies immobilisiert. Um die Sättigung der Partikel mit dem GFP-Fusionskonstrukt zu testen, wurden unterschiedliche Lysatmengen und Inkubationszeiten mit Hilfe eines *Tecan Readers* getestet und überprüft (Abbildung 4.2A, nichtlineare Ausgleichsgerade mittels GraphPad Prism 7.02).

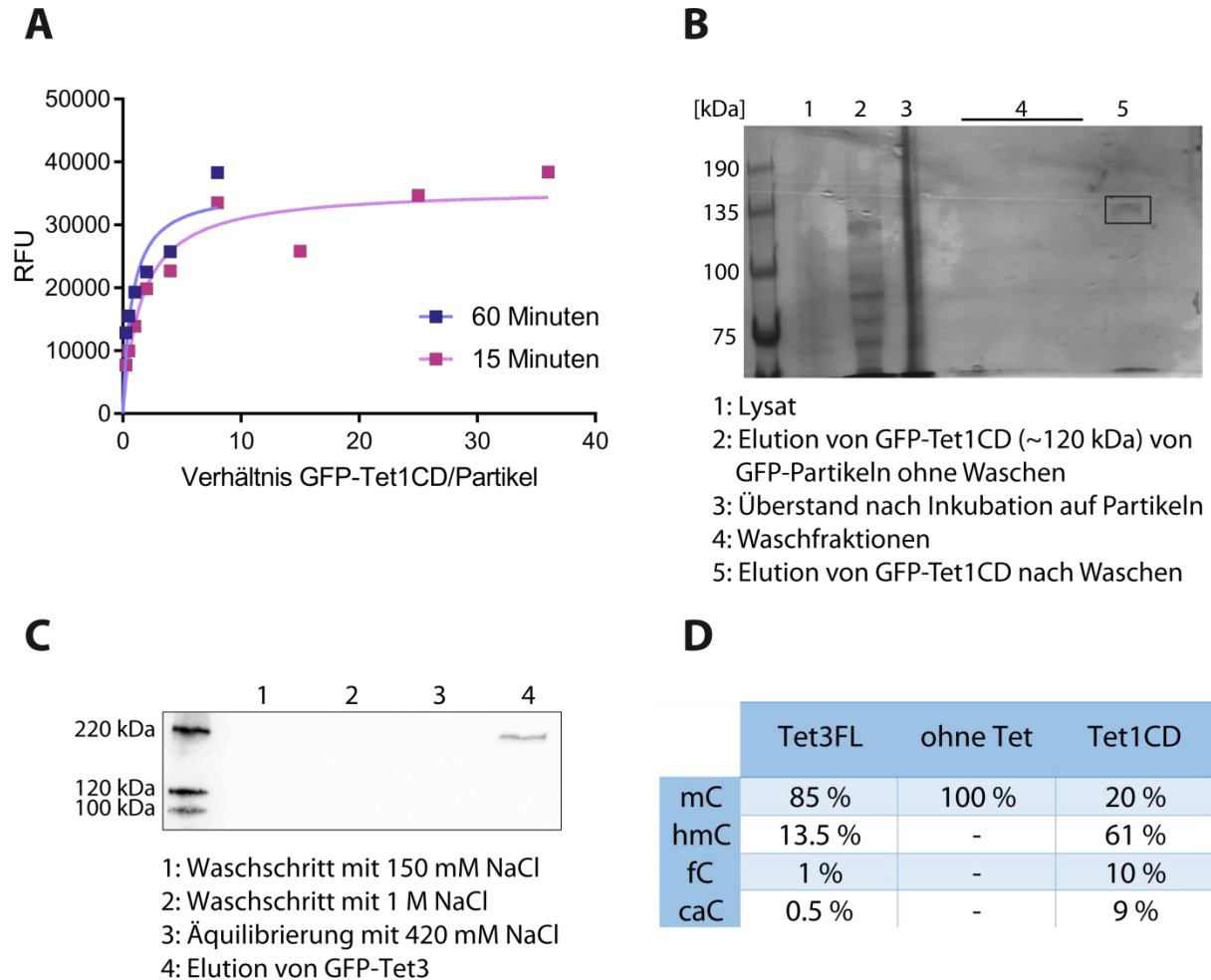


Abbildung 4.2: Aufreinigung der GFP-Tet3-beladenen Partikel. (A) Sättigung der mit der katalytischen Domäne von Tet1 (GFP-Tet1CD) beladenen GFP-Partikel. RFU = relative Fluoreszenzeinheit (*relative fluorescence units*) (B) Ein mit Coomassie gefärbtes 5% Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese-Gel (SDS-PAGE) zeigt die erfolgreiche Aufreinigung von GFP-Tet1CD. (C) Gesamter *Western Blot*, der die Schritte der Aufreinigung des kompletten Tet3-Enzyms (Tet3FL) mit einem Anti-GFP-Antikörper zur Detektion von GFP-Tet3 zeigt. In den Waschfraktionen wurde kein GFP-Tet3 nachgewiesen, wohingegen in der Elutionsfraktion nur GFP-Tet3 detektiert werden konnte. (D) Tet3 ist auf den GFP-Nanopartikeln aktiv. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse des *in-vitro*-Aktivitätstests von Tet1CD als Positivkontrolle, ohne Tet als Negativkontrolle und von Tet3FL in technischen Duplikaten.

Kontaminierende HEK293T-Proteine wurden durch ausgiebiges Waschen mit bis zu 1 M NaCl entfernt. Um zu verifizieren, dass Tet3 trotz ausgiebigen Waschens noch an den Partikeln gebunden war, wurden die Partikel nach den Waschschriffen mit 200 mM Glycin (pH = 2.5) behandelt und ein

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese-Gel (SDS-PAGE) sowie ein *Western Blot* der Fraktionen durchgeführt. Das Coomassie gefärbte SDS-PAGE-Gel in Abbildung 4.2B macht deutlich, dass die Waschschrte kontaminierende Proteine erfolgreich entfernen und die anschließende Elution nur eine Bande für das GFP-Tet-Konstrukt enthält. Abbildung 4.2C zeigt, dass dies zur Elution eines mit einem Anti-GFP-Antikörper detektierten Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 220 kDa führte. Diese Molekülmasse wird für das GFP-Tet3-Fusionsprotein erwartet.

Als nächstes wurde getestet, ob die immobilisierten Tet3-Enzyme katalytisch aktiv sind. Hierzu wurden die stringent gewaschenen Tet3-beladenen Partikel zu einer Oligonukleotidlösung gegeben. Die Lösung bestand aus Fe^{2+} , α -Ketoglutarat und Oligonukleotiden mit einem einzelnen mC im CpG-Kontext in einer zentralen Position. Die erfolgreiche Oxidation der mC-Base in die oxidierten Formen hmC, fC und caC wurde mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer, wie bereits beschrieben, bestimmt.^[116] Zum Vergleich wurde dasselbe Experiment mit der immobilisierten katalytischen Domäne von Tet1 (Tet1CD) als Positivkontrolle durchgeführt. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne Tet-Enzym. Wie in Abbildung 4.2D zu sehen, ist für Tet1CD und auch die mit Tet3 beladenen Partikel die Oxidation von mC in der DNA deutlich erkennbar. Für die Negativkontrolle allerdings nicht. Tet1CD zeigt eine etwas höhere Aktivität als Tet3. In beiden Ansätzen konnten jedoch alle Oxidationsprodukte mC, fC und caC massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

Die mit Tet beladenen Partikel wurden daraufhin als Köder verwendet, um nach interagierenden Proteinen in Zellkernextrakten unterschiedlicher Zelltypen zu suchen. Diese Zielprotein-gesättigte Co-IP-Methode ermöglicht nicht nur einen stabilen Vergleich zwischen unterschiedlichen Proben, sondern auch die Analyse von Köderproteinen mit geringer Abundanz.

Mit Hilfe dieser Methode wurden die Interaktome von Tet1, Tet3 sowie Tet3^{-CXXC} in mESCs und NPCs isoliert. Die Proben wurden anschließend mittels Massenspektrometrie und LFQ analysiert.^[359] Vier biologische Replikate wurden gemessen, um statistisch aussagekräftige Quantifizierungsdaten zu erhalten. In den Experimenten wurden Partikel mit nicht fusioniertem GFP als Negativkontrolle verwendet. Die statistische Analyse zeigt, dass diese Methode höchst reproduzierbare Datensätze liefert. Die Pearson-Korrelation in Abbildung 4.3A macht deutlich, dass die gewonnenen Daten eine hohe Korrelation zwischen den Replikaten aufweisen. Die LFQ-Intensitäten jeder Probe in Abbildung 4.3B lassen die erwartete Verteilung erkennen. Die Hauptkomponentenanalyse (*principle component analysis*, PCA) in Abbildung 4.3C zeigt die erwartete Zusammenlagerung der verschiedenen Tet-Co-IPs und GFP-Kontrollen in mESCs.

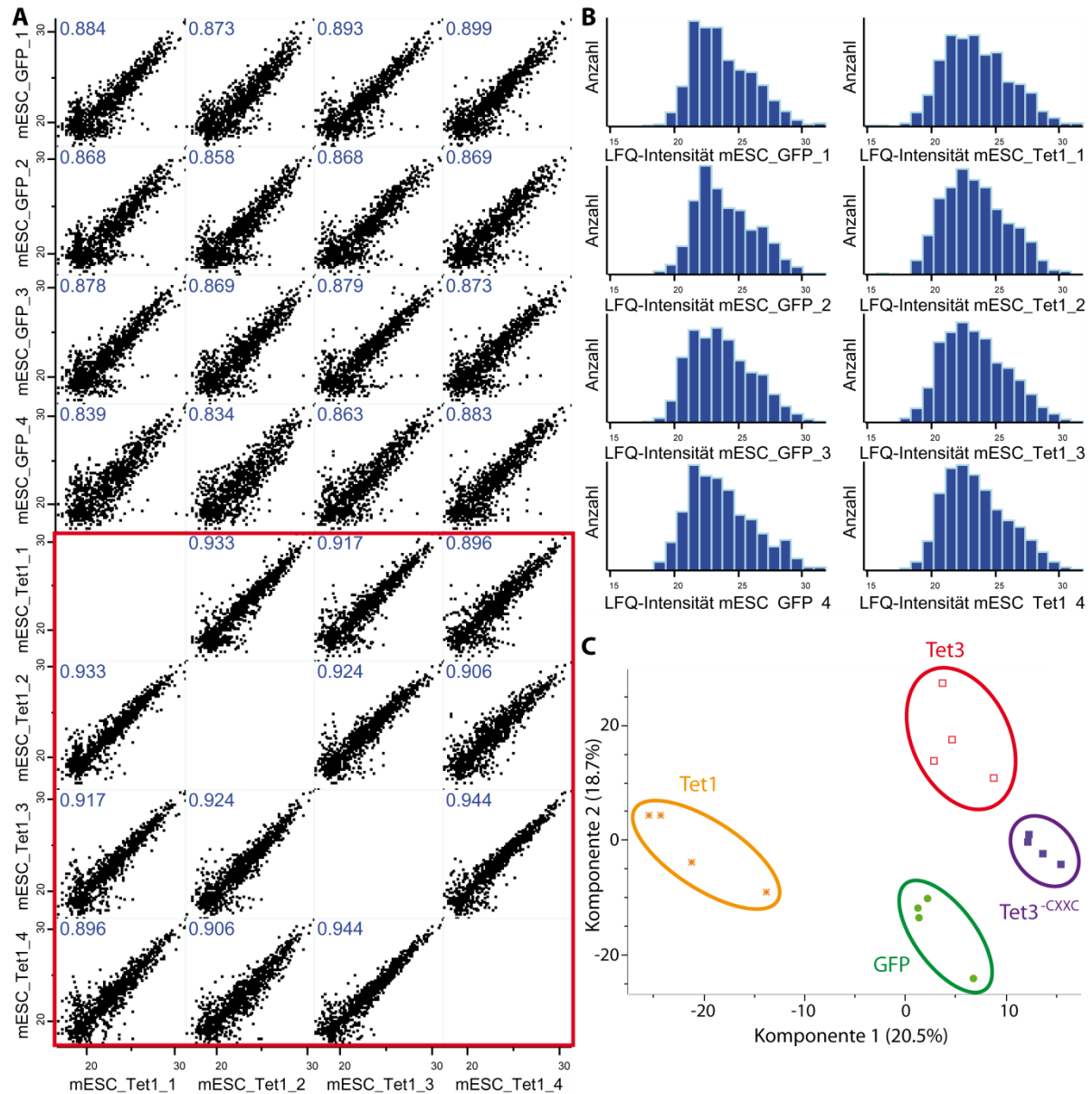


Abbildung 4.3: Übersicht über die Qualität der gewonnenen Daten aus den Tet-gesättigten Co-Immunpräzipitationen (Co-IPs) in murinen embryonalen Stammzellen (mESCs). (A) Vergleich der Intensitäten der markierungsfreien Quantifizierung (LFQ) der vier biologischen Replikate des Tet1-Experiments mit sich selbst (rotes Viereck) sowie mit der GFP-Kontroll-Co-IP in einem *Multi Scatter Plot*. Blaue Zahlen geben die Pearson-Korrelation an. (B) Histogramme zeigen die Anzahl der LFQ-Intensitäten in den vier verschiedenen biologischen Replikaten der GFP-Kontroll- und Tet1-Co-IPs. (C) Hauptkomponentenanalyse des gesamten Datensatzes der GFP- und Tet-gesättigten Co-IPs in mESCs.

4.1.1.2. Übersicht über die Tet-Interaktoren in mESCs und NPCs

Insgesamt wurden 1497 Proteine identifiziert, von denen 61 mit einem $-\log(\text{zweifache ANOVA p-Wert Interaktion})$ -Wert von > 2 angereichert sind. Die in Abbildung 4.4 dargestellte Korrelationsanalyse der gewonnenen Daten zeigt individuelle Interaktome der einzelnen Tet-Enzyme in den zwei untersuchten Zelltypen.

Eine in NPCs stark angereicherte und in mESCs abgereicherte, Zelltyp-spezifische Gruppe an Proteinen ist in Abbildung 4.4 mit einer grünen Box markiert. Diese enthält Proteine, welche in die Expression von Genen und die Bindung von Nukleinsäuren und Proteinen involviert sind (Tabelle 8.1). Die genauere Analyse zeigt, dass die Kinase *Camk2b* angereichert ist. Ebenso wurde *Suds3* identifiziert, das Teil des *Sin3a*-Komplexes ist. Dass *Suds3* bereits als Interaktor von Tet1 beschrieben wurde^[396], bestätigt die gewonnenen Daten. Überdies ist *Hmgb1* stark im NPC-Datensatz angereichert. Dieses Protein ist in die Organisation der DNA und in die Regulation der Transkription involviert. *Hmga1* ist ein weiteres transkriptionsregulierendes *High-Mobility-Group*-Protein, das in NPCs im Gegensatz zu mESCs stark angereichert ist.

Eine für mESCs Zelltyp-spezifische Häufung an Proteinen ist in Abbildung 4.4 mit einer cyanblauen Box gekennzeichnet. Der mit dieser Auswahl am signifikantesten assoziierte Genontologie-Begriff für molekulare Funktion (GO MF) und zelluläres Kompartiment (GO CC) ist die Bindung von Nukleinsäuren im Nukleus (Tabelle 8.2). Zum Beispiel ist *Nono* ein starker Tet-Interaktor in mESCs im Vergleich zu NPCs. Dieses Protein ist in die transkriptionelle Regulation involviert. Interessant ist auch, dass *Kpna3* besonders in mESCs angereichert ist, da es Kernlokalisierungssignal-Motive (*nuclear localization signal*, NLS) bindet und somit im nukleären Proteinimport eine Rolle spielt. Des Weiteren angereichert ist *Rfc2*, das mit der Replikation assoziiert ist.

Die Paralog-spezifischen Cluster sind im Vergleich zu den Zelltyp-spezifischen Clustern weniger ausgeprägt und zeigen nur in mESCs eine deutliche Trennung. Besonders interessant ist hierbei die Beobachtung, dass in mESCs mit der Modifizierung des Chromatins assoziierte Proteine in den Experimenten mit Tet3^{-CXXC} angereichert sind. Im Gegensatz dazu sind diese Proteine in den Co-IPs mit Tet1 abgereichert (violette Box in Abbildung 4.4, Tabelle 8.3). Bemerkenswert ist ebenso, dass viele der angereicherten Interaktoren von Tet3^{-CXXC} bei der Umstrukturierung des Chromatins eine Rolle spielen (*Smarchb1*, *Wdr18*, *Ino80c*, *Kdm1a*). Außerdem lässt das mit einer roten Box markierte Cluster (Tabelle 8.4) vermuten, dass Tet3 weniger in die Genexpression involviert zu sein scheint als Tet1 und Tet3^{-CXXC}.

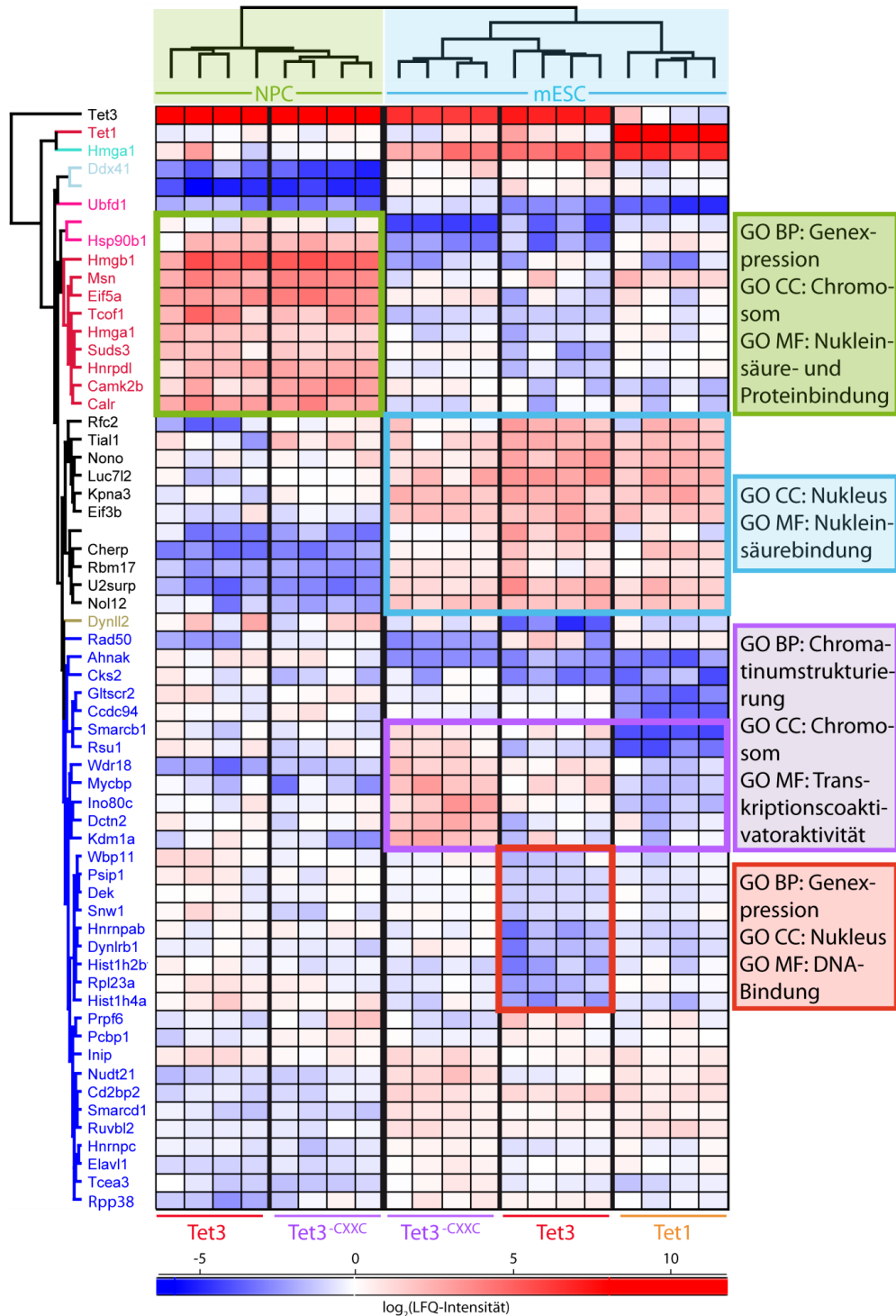


Abbildung 4.4: *Cluster-Analyse* des gesamten Datensatzes der GFP-Tet-gesättigten Co-Immunpräzipitationen (Co-IPs) in murinen embryonalen Stammzellen (mESCs) und neuralen Vorläuferzellen (NPCs). Das Korrelations-basierte *Clustering* wurde mit den log₂-transformierten Intensitäten der markierungsfreien Quantifizierung (LFQ), welche zuvor mit dem Reihemittelwert der GFP-Kontrolle subtrahiert wurden, durchgeführt. Der Farbgradient von Blau nach Rot zeigt die Zunahme der Anreicherung, die durch eine zweifache Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt wurde ($-\log(\text{zweifache ANOVA } p\text{-Wert Interaktion}) > 2$). Eine Auswahl an Genontologie(GO)-Begriffen ist gegeben (BP = biologischer Prozess, CC = zelluläres Kompartiment, MF = molekulare Funktion).

4.1.1.3. Das Interaktom von Tet1, Tet3 und Tet3^{CXXC} in mESCs

Eine detaillierte Analyse der individuellen Interaktionspartner der verschiedenen Tet-Enzyme in mESCs ist in Abbildung 4.5 gezeigt.

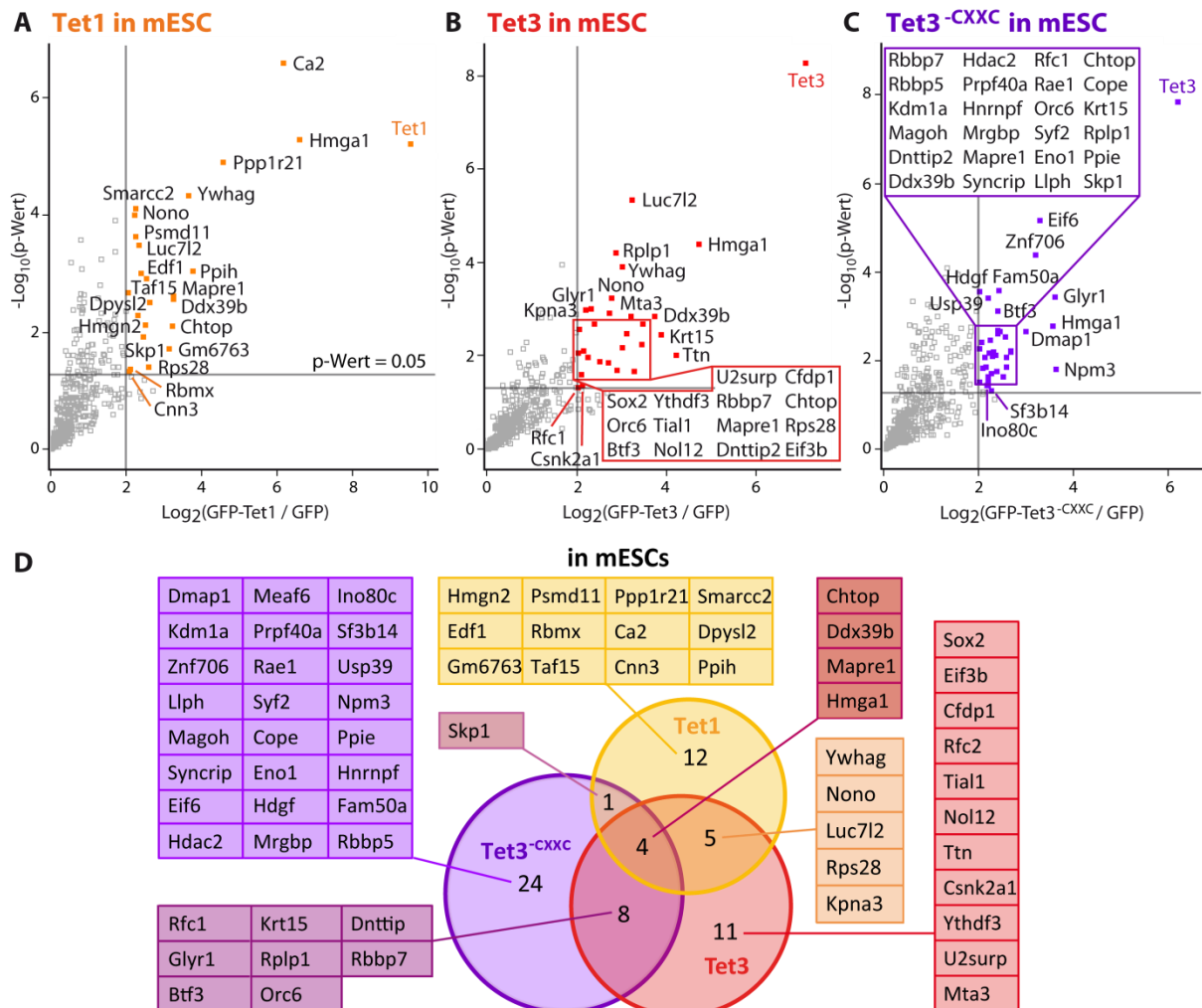


Abbildung 4.5: Übersicht über die Interaktionspartner von Tet1, Tet3 und Tet3^{CXXC} in murinen embryonalen Stammzellen (mESCs). (A-C) Volcano Plots der gesättigten Co-Immunpräzipitationen (Co-IPs) mit Tet1, Tet3 und Tet3^{CXXC} in mESCs zeigen die angereicherten, interagierenden Proteine im Vergleich zur Kontrolle mit GFP. (D) Das Venn-Diagramm stellt die unterschiedlichen und gemeinsamen Interaktoren von Tet1, Tet3 und Tet3^{CXXC} in mESCs dar.

Das Tet1-Interaktom in mESCs, das in Abbildung 4.5A dargestellt ist, lässt 22 angereicherte Proteine erkennen. Zwölf davon binden nur an Tet1, wie in Abbildung 4.5D deutlich zu erkennen ist. Zwei dieser identifizierten Interaktoren sind in die Regulation der Transkription in Kombination mit der Umstrukturierung des Chromatins involviert (Hmgn2, Smarcc2). Drei der angereicherten Proteine haben Funktionen in der Initiation der Transkription und in der Regulation der Zelldifferenzierung (Hmga1, Edf1, Taf15). In Bezug auf die spezifischen Tet1-Interaktionspartner ist besonders die

Anreicherung von Hmgn2 interessant, da dieses Protein offene Chromatinstrukturen stabilisiert. Außerdem wurde das Protein Alyref (Gm6763) als spezifischer Interaktor von Tet1 identifiziert. Dieses Protein ist Teil des TREX-Komplexes, der mRNA-Transkription mit mRNA-Prozessierung und nukleärem Export verknüpft. Andere Komponenten dieses Komplexes sind Chtop und Ddx39b, die mit allen untersuchten Tet-Enzymen in mESCs interagieren. Skp1, das sich in den Interaktomen von Tet1 und Tet3^{-CXXC} findet, ist Teil des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes. Dieser Komplex vermittelt die Ubiquitinierung von Proteinen, welche in die Transkription und Signaltransduktion sowie in den Zellzyklusablauf involviert sind. Zusammengefasst deuten die Daten darauf hin, dass Tet1 eine Rolle in der Regulation der Transkription spielt.^[397]

Als nächstes wurden die Interaktionspartner von Tet3^{-CXXC} untersucht, die in Abbildung 4.5C dargestellt sind. Da bekannt ist, dass die CXXC-Domäne die Bindung von CpG-enthaltender DNA vermittelt,^[398, 213] sollte durch die Analyse des Tet3^{-CXXC}-Interaktoms die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die CXXC-Domäne allgemein DNA-bindende Proteine präzipitiert, welche nicht spezifisch Tet3 binden. Bei dem Vergleich der Interaktionspartner von Tet3 und Tet3^{-CXXC} stellte sich hierbei heraus, dass mehr Proteine und insbesondere eine größere Anzahl DNA-bindender Proteine in den Co-IPs mit Tet3^{-CXXC} angereichert sind. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die DNA-bindende Fähigkeit der CXXC-Domäne nicht die experimentellen Ergebnisse verfälscht. Außerdem wurden die Proben mit einer Nuklease behandelt, um etwaige Interaktionen über gebundene DNA auszuschließen.

Insgesamt wurden zwölf Proteine detektiert, die Tet3 sowie Tet3^{-CXXC} binden, während 24 Proteine spezifisch für Tet3^{-CXXC} angereichert sind. Einige dieser exklusiven Tet3^{-CXXC}-Interaktoren sind transkriptionelle Repressoren (Znf706, Eno1, Hdgf). Überdies sind viele der identifizierten Proteine in die Umstrukturierung des Chromatins involviert (Kdm1a, Hdac2, Dmap1, Meaf6, Mrgbp, Ino80c, Rbbp5, Rbbp7). Die Daten zeigen, dass von allen untersuchten Tet-Enzymen Tet3^{-CXXC} speziell Proteine rekrutiert, welche mit Histonen interagieren, DNA modifizieren und Interaktoren von Histonmodifikationen sind. Diese Beobachtung wird von einer GO-Analyse unterstützt, die Genexpression (p-Wert = $5.4 \cdot 10^{-10}$) und Chromatinmodifikation (p-Wert = $5.1 \cdot 10^{-4}$) als signifikant angereicherte biologische Prozesse aufzeigt.

In den Abbildungen 4.5B und D deutlich zu erkennen, weist das Interaktom von Tet3 in mESCs etwas mehr Proteine auf als das von Tet1. Neun Tet3-Interaktoren wurden bereits im Tet1-Interaktom identifiziert, während 19 weitere Interaktionspartner für Tet3 entdeckt wurden. Interessant ist hierbei die Entdeckung des Pluripotenz- und Transkriptionsfaktors Sox2 als spezifischer Interaktor von Tet3.^[399] Pluripotenzfaktoren, welche bereits als Interaktionspartner der Tet-Enzyme bekannt

waren, sind Nanog und Oct4.^[229, 400] Von diesen konnte Oct4 als schwacher Interaktor von Tet3 bestätigt werden ($\log_2(\text{GFP-Tet3/GFP}) = 2.5$; $-\log(\text{p-Wert}) = 1.1$). Weitere Tet3-Interaktionspartner sind Ywhag, ein Phosphopeptid-bindendes regulatorisches Adaptorprotein, sowie Csnk2a1, die katalytische Untereinheit eines Serin/Threonin-Protein-Kinase-Komplexes. Diese Proteine weisen auf eine mögliche Regulierung durch Phosphorylierung hin. Die Colokalisation zwischen Tet3 und Ywhag konnte zudem durch eine ICC bestätigt werden (Abbildung 4.6). Die colokalisierte Pixelkarte zeigt überlappende Signale zweier unterschiedlicher Antikörper von Grau zu Weiß. Ein weißer Punkt kennzeichnet eine klare Colokalisation, da die Signale beider Antikörper an dieser Stelle sehr stark sind.

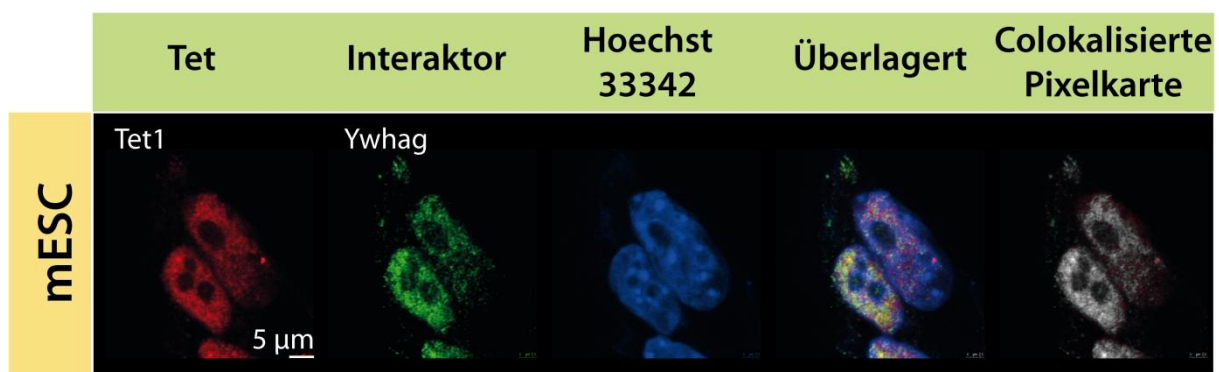


Abbildung 4.6: Colokalisierung von Tet1 und Ywhag in murinen embryonalen Stammzellen (mESCs). Immuncytochemie in Kombination mit Fluoreszenzmikroskopie bestätigt die Interaktion zwischen Tet1 und Ywhag in mESCs (ImageJ 2.0.0, *Colocalization Threshold*).

Im Tet3-Interaktom in mESCs dominieren Proteine, die in die Regulation der Transkription (Mta3, Btf3, Sox2, Nono) und Replikation (Rfc1, Rfc2, Orc6) involviert sind. Des Weiteren konnten das Histon-bindende Protein Rbbp7 zusammen mit Gylr1, das Chromatinmodifikationen bindet, als Tet3-Interaktoren identifiziert werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass Tet3 eine höhere Tendenz zur Interaktion mit Chromatin-assoziierten Proteinen hat als Tet1.

Interessanterweise wurde Chtop als Interaktor aller untersuchten Tet-Enzyme nachgewiesen. Diese Beobachtung unterstützt die kürzliche Entdeckung, dass hmC den Chtop-Methylosom-Komplex rekrutiert, um die Transkription zu initiieren.^[401]

4.1.1.4. Vergleich des Interaktoms von Tet1 in TKO-Zellen und mESCs

Schwache Interaktionen können möglicherweise nicht detektiert werden, wenn die exogenen, Partikel-gebundenen Proteine mit endogen produzierten Tet-Proteinen konkurrieren. Aus diesem Grund wurde das Experiment mit Tet1 in TKO-Zellen wiederholt. Würden Proteine im Tet1-Interaktom der TKO-Zellen auftauchen, die mit der GFP-Tet-gesättigten Co-IP in mESCs nicht identifiziert wurden, wäre dies ein Anzeichen dafür, dass die exogenen Tet-Köder nicht in der Lage sind, existierende Komplexe zu trennen. Die Ergebnisse dieses Experiments, die in Abbildung 4.7 dargestellt sind, zeigten allerdings keine großen Unterschiede zwischen dem Tet1-Interaktom der TKO-Zellen im Vergleich zu den Daten aus den mESCs, da sie nicht getrennt voneinander clustern. Die GFP-Co-IPs aus TKO- und WT-Zellen hingegen zeigen leichte Unterschiede, weswegen die Daten aus den unterschiedlichen Zelltypen getrennte Cluster bilden. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die Tet-Köder die Interaktionsprofile korrekt darstellen.

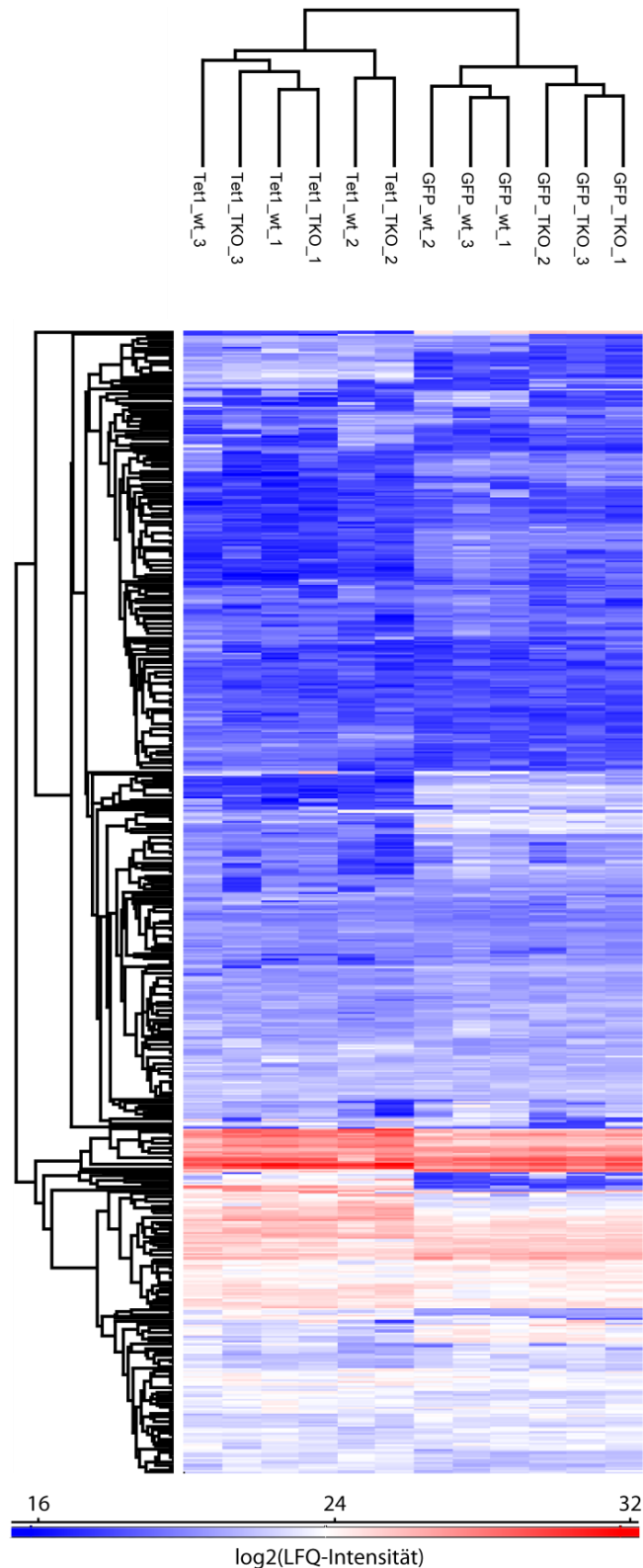


Abbildung 4.7: Die GFP-Tet-gesättigte Co-Immunpräzipitation (Co-IP) wird nicht durch konkurrierende, endogene Tet-Enzyme verfälscht. Die *Cluster-Heatmap* vergleicht die Triplikate der Tet1-Co-IP und der GFP-Kontrolle in Wildtyp (wt) und Tet1-3 dreifach ausgeschalteten (TKO) murinen embryonalen Stammzellen. Die Cluster-Analyse gruppiert die Proteine der verschiedenen Co-IPs anhand ihrer Intensitäten der markierungsfreien Quantifizierung (LFQ), welche durch einen Farbgradienten dargestellt sind.

4.1.1.5. Das Interaktom von Tet3 und Tet3^{-CXXC} in NPCs

Es ist zu erwarten, dass sich die Interaktionsprofile im Laufe der Differenzierung ändern. Um diesen Prozess zu untersuchen, wurden NPCs analysiert, die im Vergleich zu mESCs differenzierter sind. Da Tet3 und Tet3^{-CXXC} die dominierenden Isoformen in diesen Zellen sind^[208], wurden für diese Studie die Interaktome dieser beiden Tet-Enzyme bestimmt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildungen 4.8A und B zusammengefasst.

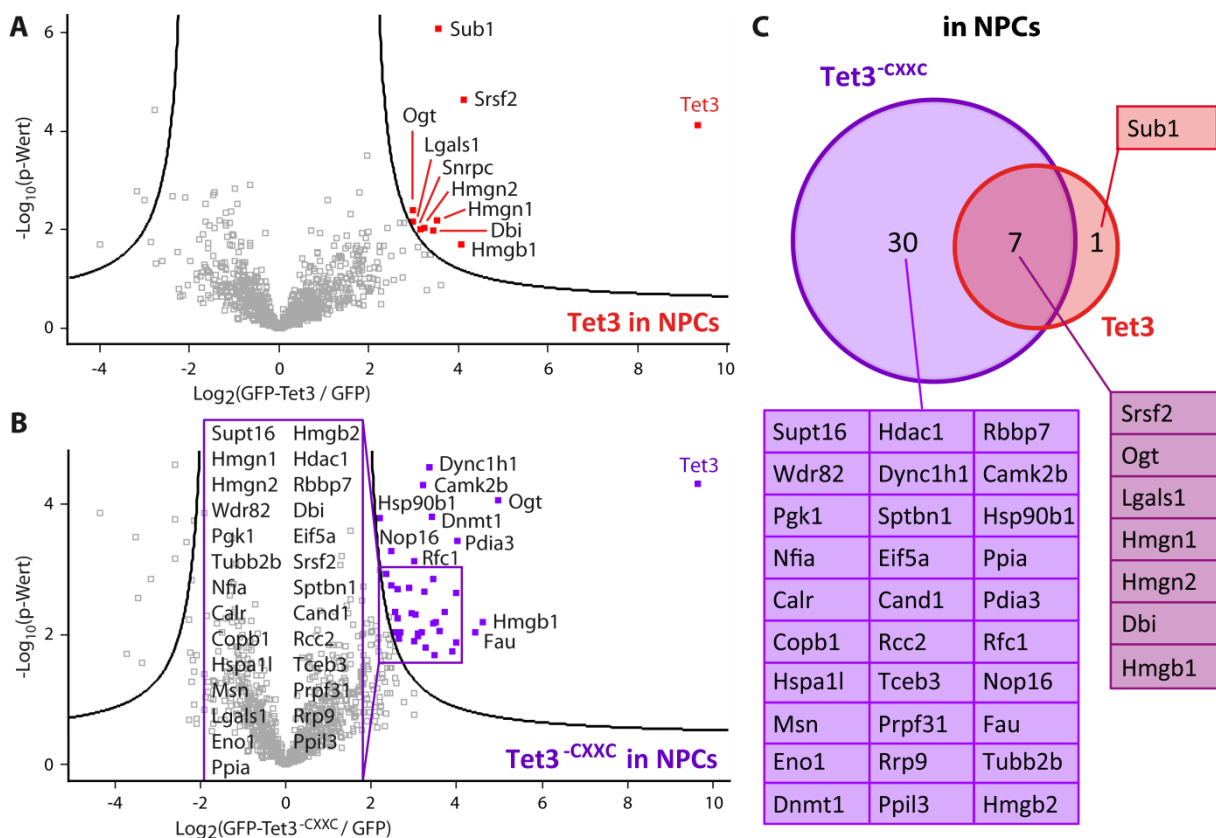


Abbildung 4.8: Übersicht über die Interaktionspartner von Tet3 und Tet3^{-CXXC} in neuronalen Vorläuferzellen (NPCs). (A-C) Volcano Plots der gesättigten Co-Immunpräzipitationen (Co-IPs) mit Tet3 und Tet3^{-CXXC} in NPCs zeigen die angereicherten, interagierenden Proteine im Vergleich zur Kontrolle mit GFP ($s_0 = 2$; False Discovery Rate (FDR) = 0.05). (D) Das Venn-Diagramm stellt die unterschiedlichen und gemeinsamen Interaktoren von Tet3 und Tet3^{-CXXC} in NPCs dar.

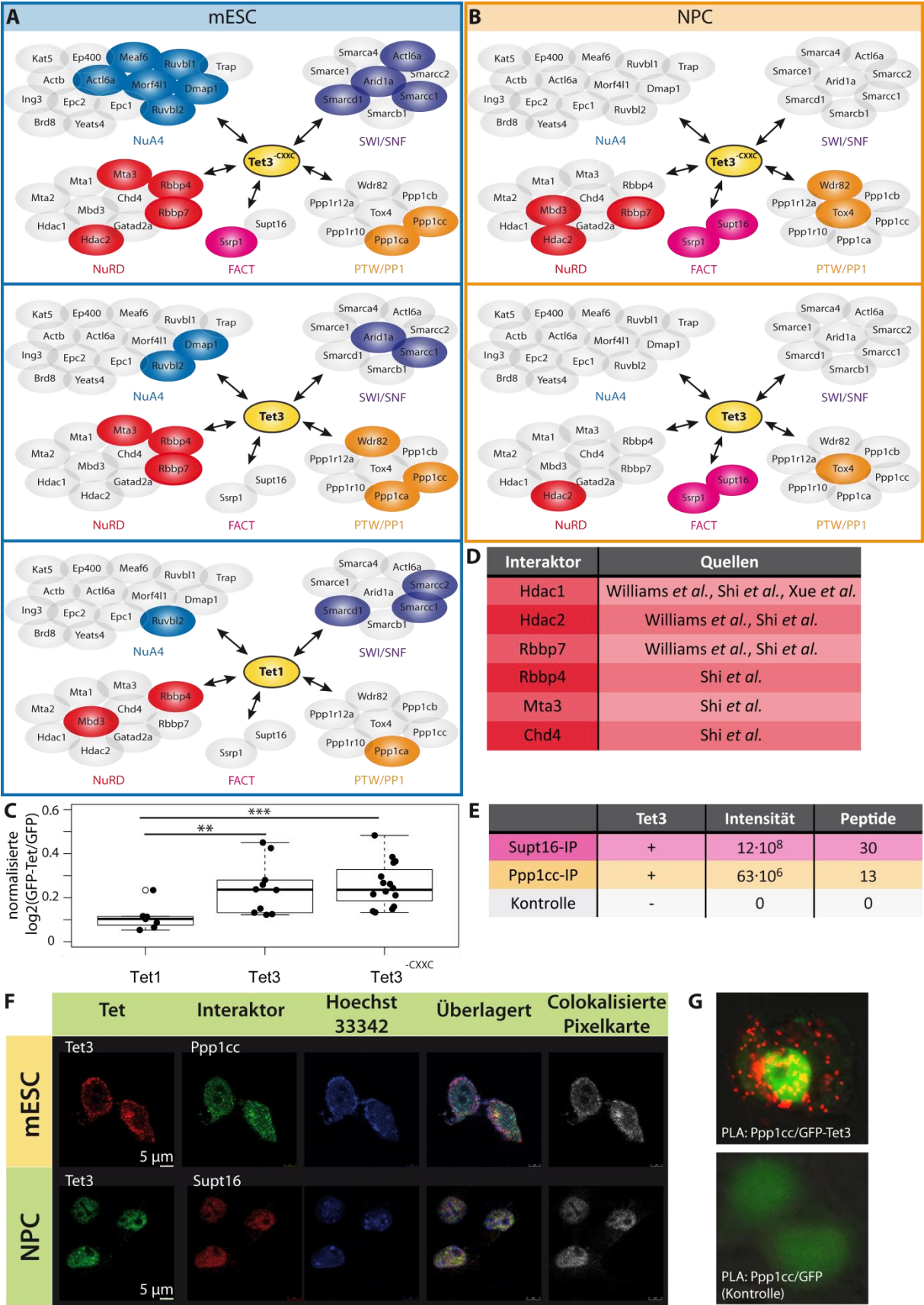
In Abbildung 4.8C ist deutlich zu erkennen, dass erneut mehr Interaktionspartner für Tet3^{-CXXC} im Vergleich zu Tet3 entdeckt werden konnten. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise durch die Tatsache erklären, dass Tet3^{-CXXC} in neuronalen Zellen abundanter ist als Tet3.^[208] Unter den Proteinen, die beide Tet3-Isoformen binden, sind die *High-Mobility-Group*-Proteine (Hmgn1, Hmgn2, Hmgb1) besonders abundant. Diese Proteine verändern die Zugänglichkeit des DNA-Duplexes im Chromatin. Einer der Interaktoren von Tet3 ist Lgals1, das in die Regulation der Apoptose,

Proliferation und Differenzierung involviert ist. Ein weiteres angereichertes Protein ist Sub1, ein allgemeiner Coaktivator, der mit TATA-Box-bindenden-Protein-assoziierten Faktoren (*TATA-box binding Protein Associated factors*, TAFs) als Vermittler zwischen Aktivatoren und der Transkriptionsmaschinerie kooperiert.

Sieben der neun Proteine, die im Tet3-Datensatz angereichert sind, interagieren ebenfalls mit Tet3^{-CXXC}. Ein spezifischer Interaktor von Tet3^{-CXXC} ist Dnmt1, die für die Erhaltung der DNA-Methylierung verantwortlich ist. Zudem ist interessant, dass Dnmt1 zu den Proteinen gehört, die eine CXXC-Domäne enthalten. Ein zusätzliches Protein, das Tet3^{-CXXC} bindet ist Rcc, das die Kondensation des Chromosoms reguliert. Weitere Tet3^{-CXXC}-Interaktionspartner sind Ogt, Hdac1, Rbbp7, Hmgb2, Wdr82 und Supt16, die alle in die Organisation des Chromatins und die Modifizierung des Nukleosoms involviert sind. Beachtenswert ist, dass Ogt im Datensatz vorhanden ist. Da dieses Enzym ein bekannter Interaktor der Tet-Enzyme ist^[347, 238], bestätigt dies erneut die generierten Daten. Die Tet3^{-CXXC}-Interaktionspartner beinhalten außerdem Proteine wie Rfc1, Tceb3 und Nfia, welche in die Regulation der DNA-Transkription und die Replikation involviert sind. Ferner konnte Eno1 detektiert werden, das als myc-Promoter-bindender Transkriptionsrepressor agiert. Ein weiterer Interaktor von Tet3^{-CXXC} ist Eif5a, das die Apoptose reguliert. Dieses Protein spielt vermutlich eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Gehirns und könnte auf diese Weise Tet3^{-CXXC} mit der neuronalen Entwicklung in Verbindung bringen.^[264, 249]

4.1.1.6. Vergleich der Interaktion von Chromatin-modifizierenden Proteinkomplexen mit Tet1, Tet3 und Tet3^{-CXXC}

Um generelle Trends in den Daten zu entdecken, wurden die statistisch angereicherten Interaktoren von Tet1, Tet3 und Tet3^{-CXXC} mit Hilfe von *Volcano Plots* analysiert. Da die meisten Interaktionspartner mit der Modifizierung des Chromatins assoziiert sind, wurde der Fokus hierbei insbesondere auf Proteinkomplexe gerichtet, die in die Umstrukturierung des Chromatins involviert sind, wie NuA4, SWI/SNF, NuRD, FACT und PTW/PP1. Tabelle 8.5 fasst diese Proteine und ihre Anreicherung in den Datensätzen zusammen. Abbildungen 4.9A und B illustrieren die Zusammenhänge basierend auf den Daten aus Tabelle 8.5 und 8.6. Proteine, die eine starke Interaktion zeigen (mehr als zweifach angereichert mit einem p-Wert < 0.05), sind farblich markiert.



embryonalen Stammzellen (mESCs) (A) und neuralen Vorläuferzellen (NPCs) (B). Farblich markierte Proteine haben einen p-Wert < 0.05 und sind mehr als zweifach angereichert. (C) Boxplot der auf Tet1, Tet3 und Tet3^{-CXXC} normalisierten $\log_2(\text{GFP-Tet}/\text{GFP})$ -Werte der signifikant angereicherten Proteinkomplexe aus (A). (D) Liste der Tet-Interaktoren, die bereits identifiziert wurden.^[216, 396, 402] (E) Tet3 wurde in den reversen Co-Immunpräzipitations-Experimenten mit Supt16 und Ppp1cc identifiziert (+). Die Intensitäten der markierungsfreien Quantifizierung (LFQ) sowie die Zahl der eindeutigen Peptide von Tet3 sind angegeben. (F) Immunocytochemie-Experimente zeigen die Colokalisation von Ppp1cc und Tet3 in mESCs sowie von Supt16 und Tet3 in NPCs (ImageJ 2.0.0, *Colocalization Threshold*). (G) *Proximity Ligation Assay* (PLA) von GFP-Tet3 und Ppp1cc in mESCs. Grüne Signale repräsentieren GFP-Tet3, während rote Signale die Interaktion zwischen Tet3 und Ppp1cc aufzeigen.

Diese Analyse bestätigt, dass Tet1 nur schwach mit Chromatin-modifizierenden Komplexen interagiert. Nur wenige Interaktionen mit dem Chromatin-modifizierenden SWI/SNF-Komplex (Smarcc1, Smarcc2, Smarcd1), dem NuA4-Histon-Acetylase-Komplex (Ruvbl2), dem PTW/PP1-Komplex (Ppp1ca) und dem NuRD-Deacetylase-Komplex (Rbbp4, Mbd3) konnten beobachtet werden.

Im Gegensatz zu Tet1, zeigen die Daten eine statistisch hochsignifikante Anreicherung von Chromatin-modifizierenden Komplexen für Tet3 (t-Test p-Wert = 0.0096 für Tet3 und t-Test p-Wert = 0.0004 für Tet3^{-CXXC}). Abbildung 4.9C veranschaulicht die Daten von Tet1, Tet3 und Tet3^{-CXXC} in einem Boxplot. Der erkennbare Unterschied zwischen Tet1 und Tet3 beziehungsweise Tet3^{-CXXC} bekräftigt die Idee, dass Tet3 an stark chromatinisierter DNA arbeitet. Besonders starke Tet3-Interaktionen wurden mit Arid1a des SWI/SNF-Komplexes, Dmap1 und Ruvbl2 des NuA4-Komplexes, Wdr82, Ppp1ca und Ppp1cc des PTW/PP1-Komplexes sowie Mta3 und Rbbp7 des NuRD-Komplexes festgestellt. Eine noch stärkere Korrelation mit Chromatin-modifizierenden Komplexen ist für Tet3^{-CXXC} vorhanden. Da diese zudem den FACT-Komplex mit einschließt, lässt sich vermuten, dass Tet3 und besonders Tet3^{-CXXC} an stärker chromatinisierter DNA aktiv sind.

Die meisten Komponenten des NuRD-Komplexes wurden bereits als Tet-Interaktoren entdeckt. Eine Übersicht über diese interagierenden Proteine ist in Abbildung 4.9D gegeben. Diese nachgewiesenen Interaktionspartner bekräftigen demzufolge die gewonnenen Daten aus der Tet-gesättigten Co-IP.

Der Zusammenhang zwischen Tet3 und dem PTW/PP1-Komplex ist besonders interessant, da er aus zahlreichen Phosphatasen der Ppp1-Familie besteht, die in die Regulation der Tet-Enzyme involviert sein könnten.^[347] Zur Validierung der Interaktion von Tet3 mit dem PTW/PP1-Komplex wurde eine reverse Co-IP mit einem Antikörper gegen Ppp1cc durchgeführt. Abbildung 4.9E zeigt, dass Tet3 mit 13 eindeutigen Peptiden tatsächlich in dem Datensatz der Ppp1cc-Co-IP identifiziert wurde. Die Colokalisation von Tet3 und Ppp1cc wurde des Weiteren mittels ICC und Fluoreszenzmikroskopie bestätigt, wie in Abbildung 4.9F zu sehen. Um die physikalische Interaktion zwischen Tet3 und

Ppp1cc zu untersuchen, wurde zudem ein PLA mit gegen Tet3 beziehungsweise Ppp1cc gerichteten Antikörpern in mESCs durchgeführt. Die konfokale Analyse des Experiments, welche in Abbildung 4.9G dargestellt ist, zeigt ein starkes Colokalisationssignal und bestätigt somit die direkte Interaktion von Tet3 mit Ppp1cc.

Interessant sind auch die Daten für Tet3 und Tet3^{-CXXC} in NPCs. Hier wurde eine starke Interaktion mit den Komponenten des FACT-Komplexes, Supt16 und Ssrp1 entdeckt. Dieser Proteinkomplex ist essentiell für die produktive Transkription von chromatinisierter DNA durch die RNA-Polymerase II in nicht endgültig differenzierten Zellen.^[403] Diese Interaktion unterstützt daher die Hypothese, dass die Funktion von Tet3 und Tet3^{-CXXC} ist, an chromatinisierter DNA zu arbeiten. Um die Tet3-FACT-Interaktion zu validieren, wurde eine ICC in NPCs und eine reverse Co-IP mit einem Antikörper gegen Supt16 durchgeführt. Die Ergebnisse in Abbildung 4.9E und F bestätigen Supt16 als Interaktionspartner von Tet3.

4.1.1.7. Lokalisation von Tet3 im Heterochromatin

Zur weiteren Untersuchung der Assoziation von Tet3 mit heterochromatinisierter DNA, wurde ICC und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt, um die Lokalisation von Tet1 und Tet3 im Heterochromatin näher zu bestimmen. Hierzu wurde ein Antikörper gegen den Heterochromatinmarker H3K9me3 verwendet, um Heterochromatinbereiche im Zellkern zu lokalisieren. Zur Lokalisation der verschiedenen Tet-Enzyme wurde ein zweiter Antikörper entweder gegen Tet1 oder Tet3 genutzt. Die Ergebnisse der Lokalisationsstudien sind in Abbildung 4.10 zusammengefasst. Deutlich zu erkennen ist, dass Tet3 im Gegensatz zu Tet1 tatsächlich mit dem Heterochromatinmarker H3K9me3 colokalisiert.

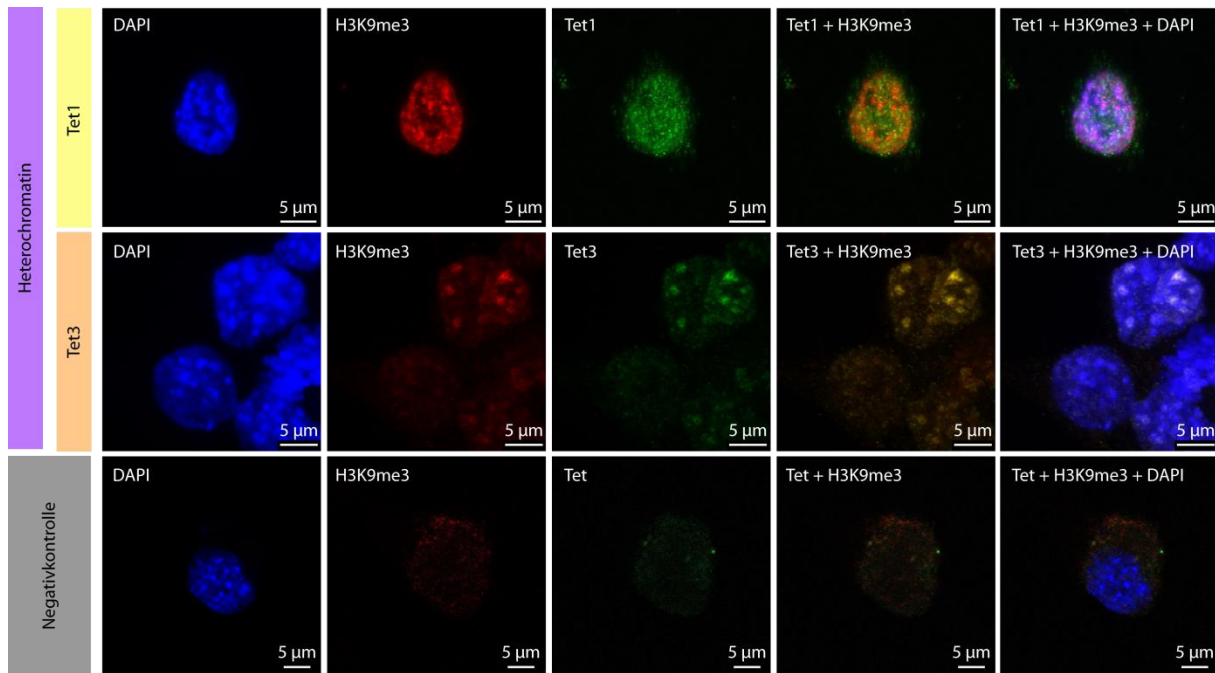


Abbildung 4.10: Tet3 colokalisiert mit dem Heterochromatinmarker H3K9me3 im Zellkern von murinen embryonalen Stammzellen (mESCs). Die Zellen wurden mit Anti-H3K9me3-Antikörpern (rot) und jeweils Anti-Tet1-Antikörpern (grün) oder Anti-Tet3-Antikörpern (grün) behandelt. Zum Anfärben der DNA wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet. Die Negativkontrolle wurde nur mit sekundären Antikörpern durchgeführt. Alle Aufnahmen wurden mit denselben Einstellungen aufgenommen.

4.1.1.8. Diskussion

Die Affinitätsproteomik-Daten lassen individuelle, Zelltyp- und Paralog-spezifische Interaktome für Tet1, Tet3 und Tet3^{-CXXC} erkennen. Bemerkenswert ist, dass zahlreiche Interaktoren identifiziert wurden, welche in die Erkennung und den Transfer von Phosphatgruppen involviert sind. Indem Phosphatgruppen hinzugefügt (Kinasen Camk2b und Csnk2a1), entfernt (Phosphatasen Ppp1cc und Ppp1ca) oder geschützt (Ywhag) werden, könnte die Aktivität der Tet-Enzyme reguliert werden. Ein weiterer interessanter Interaktor ist Dnmt1, die den Methylierungszustand nach der Replikation aufrechterhält. Da diese Interaktion einen Weg darstellen könnte, nicht nur den Methylierungs-, sondern auch den Hydroxymethylierungsstatus der DNA zu vererben, sind weitere Experimente erforderlich, um eine funktionelle Interaktion *in vivo* zu bestätigen. Eine Interaktion zwischen Tet3^{-CXXC} und der CXXC-Domäne enthaltenden Dnmt1 könnte außerdem möglicherweise einen Ersatz für die fehlende CXXC-Domäne von Tet3^{-CXXC} darstellen.

Des Weiteren konnten die Daten zeigen, dass das Tet3-Interaktom von Proteinen dominiert wird, welche die Chromatinstruktur und DNA-Zugänglichkeit in einer chromatinisierten Umgebung regulieren. Zu dieser Beobachtung passt eine Studie, die Tet3 ebenfalls in Zusammenhang mit der Chromatinzugänglichkeit in B-Zellen bringt.^[404] Zudem lassen die Daten vermuten, dass Tet1 an DNA arbeitet, die in einer offenen, aktiven Chromatinstruktur vorliegt, um die hmC-Level aufrechtzuerhalten.^[397] Diese Hypothese ist in Einklang mit der dominierenden Produktion von Tet1 in mESCs, wo das Genom als nur locker chromatinisiert beschrieben wird.^[405-407] Während des Differenzierungsprozesses, der sowohl die Aktivierung als auch die Stilllegung von Genen involviert, ist Tet3 hochreguliert.^[266, 408, 208, 118, 267] In Übereinstimmung mit diesem Expressionsprofil, konnte nachgewiesen werden, dass Tet3 stark mit Chromatin-modifizierenden Faktoren (SWI/SNF), Histon-modifizierenden Komplexen (NuRD, NuA4) und Proteinen des PTW/PP1-Komplexes interagiert. Alle diese Proteinkomplexe regulieren die Chromatinstruktur und DNA-Zugänglichkeit. Obwohl ein paar dieser Interaktionen auch mit Tet1 beobachtet wurden, sind sie für Tet3 signifikant stärker (t-Test p-Wert < 0.01). Eine Hochregulierung von Tet3 während der Stammzellentwicklung findet hier eine Erklärung, da diese Interaktionen einen Zugang zu stärker chromatinisierten Genombereichen ermöglichen können. Die Idee, dass Tet3 an chromatinisierter DNA aktiv ist, wurde letztendlich durch ICC und Fluoreszenzmikroskopie gestützt. Diese Experimente zeigten, dass Tet3 mit dem Heterochromatinmarker H3K9me3 colokalisiert. In Übereinstimmung mit dieser Feststellung, konnten die NPC-Daten eine Interaktion von Tet3 und Tet3^{-CXXC} mit Supt16 und Ssrp1 nachweisen. Diese beiden Proteine bilden den FACT-Komplex, der für die Transkription von chromatinisierter DNA benötigt wird. Die Daten unterstützen daher die Hypothese, dass Tet3 und Tet3^{-CXXC} für die Produktion von hmC in transkribierten Genkörpern verantwortlich sind.^[266, 409]

Autorenbeiträge

Die Experimente und die Datenanalyse wurden zusammen mit Franziska Traube durchgeführt. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit Hilfe von Victoria Splith und Stylianos Michalakis ausgeführt. Edris Parsa führte die Tet-Aktivitätstests durch. David Eisen, Michael Stadlmeier und Benjamin Hackner halfen bei der massenspektrometrischen Analyse. Die Zellkultur-Experimente wurden zusammen mit Angie Kirchner durchgeführt. Markus Müller, Fabio Spada und Stylianos Michalakis halfen, die Ergebnisse zu diskutieren und zu interpretieren. Fabio Spada stellte die NPCs zur Verfügung. Jürgen Cox half bei der statistischen Analyse der Daten. Thomas Carell entwickelte und betreute die Studie und interpretierte die Daten. Das Manuskript wurde zusammen mit Franziska Traube, Fabio Spada und Thomas Carell geschrieben.

4.1.2. Ein Netzwerk metabolischer Enzyme kontrolliert die Tet3-Aktivität im Gehirn

Bisher wurden die höchsten hmC-Level im erwachsenen Gehirn gemessen.^[97, 32, 63] Hier wurde gezeigt, dass hmC die Transkription beeinflusst^[93, 88, 95, 398, 90] und die hmC-Level durch neurale Aktivität dynamisch reguliert werden.^[79-82] Daher sollten in dieser Studie die Interaktionspartner der Tet-Enzyme im Gehirn von Mäusen analysiert werden. In Kapitel 1.2.6 wurde bereits beschrieben, dass Tet3 und Tet3^{-CXXC} die dominierenden Tet-Proteine in differenziertem Gewebe, einschließlich des Gehirns, sind.^[264, 208, 265, 267, 249] Aus diesem Grund wurden die Interaktome von Tet3 und Tet3^{-CXXC} im Gehirn von Mäusen untersucht.

Die durch die Tet-Enzyme katalysierte Oxidation von mC benötigt α -Ketoglutarat als Cosubstrat, welches zu Succinat und CO₂ konvertiert wird.^[203, 173] Diese strikte Abhängigkeit von α -Ketoglutarat generiert ein ungelöstes Versorgungsproblem. α -Ketoglutarat wird typischerweise in den Mitochondrien hergestellt und es ist unklar, wie es die Tet-Enzyme im Zellkern erreicht. Da gezeigt werden konnte, dass die Verfügbarkeit von α -Ketoglutarat ratenbestimmend in verschiedenen Geweben und in mESCs ist, könnte die Kontrolle der α -Ketoglutarat-Versorgung eine Möglichkeit zur Regulierung der Tet-Aktivität darstellen.^[410, 338]

Um Informationen über die Tet3-Interaktionspartner im Gehirngewebe zu erlangen, wurden Affinitätsproteomik-Studien durchgeführt. Bei der Analyse des Interaktoms wurde insbesondere nach Enzymen gesucht, welche in der Biosynthese von α -Ketoglutarat involviert sind. Auf diese Weise sollten Tet3-Interaktoren gefunden werden, die helfen können, Tet3 mit α -Ketoglutarat zu versorgen. Für das Experiment wurde die bereits in Kapitel 4.1.1.1. beschriebene Tet-gesättigte Co-IP-Methode angewendet. Mit Tet3 oder Tet3^{-CXXC}-beladene Partikel wurden hierbei als Köder verwendet, um nach interagierenden Proteinen in Zellkernextrakten des gesamten Gehirns erwachsener Mäuse zu fischen. Die Proben wurden mittels Massenspektrometrie und LFQ analysiert.^[359] Vier biologische Replikate wurden gemessen, um statistisch aussagekräftige Quantifizierungsdaten zu erhalten. In den Experimenten wurden Partikel mit nicht fusioniertem GFP als Negativkontrolle verwendet. Die statistische Analyse der Daten zeigt, dass diese Methode höchst reproduzierbare Datensätze liefert. Die Pearson-Korrelation in Abbildung 4.11A zeigt, dass die gewonnenen Daten eine hohe Korrelation zwischen den Replikaten aufweisen. Die Intensitätsprofile in Abbildung 4.11B lassen die erwartete Datenverteilung zwischen den Proben erkennen.

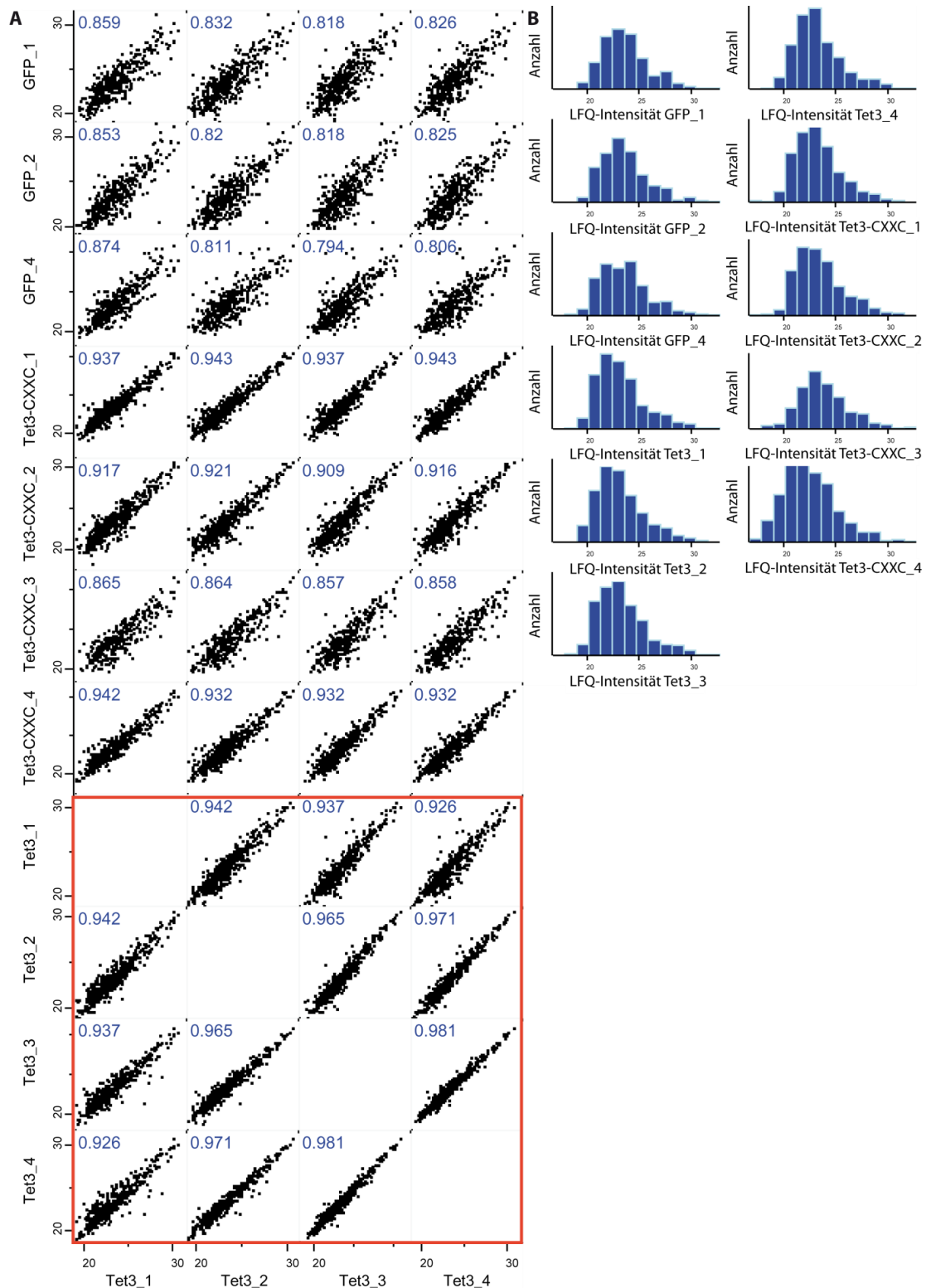


Abbildung 4.11: Übersicht über die Qualität der gewonnenen Daten aus den Tet-gesättigten Co-Immunpräzipitationen (Co-IPs) im Gehirn von Mäusen. (A) Vergleich der Intensitäten der markierungsfreien Quantifizierung (LFQ) der vier biologischen Replikate des Tet3-Experiments mit sich selbst (rotes Viereck) sowie mit den GFP- und Tet3^{-CXXC}-Co-IPs in einem *Multi Scatter Plot*. Blaue Zahlen geben die Pearson-Korrelation an. (B) Histogramme zeigen die Anzahl der LFQ-Intensitäten im Datensatz.

4.1.2.1. Tet3 interagiert mit metabolischen Enzymen

Die auf diese Weise gewonnenen Daten, welche in Abbildung 4.12 zusammengefasst sind, zeigen eine Vielzahl interessanter Interaktoren wie Pura, Uba1, Uchl1 und Mark1-3.

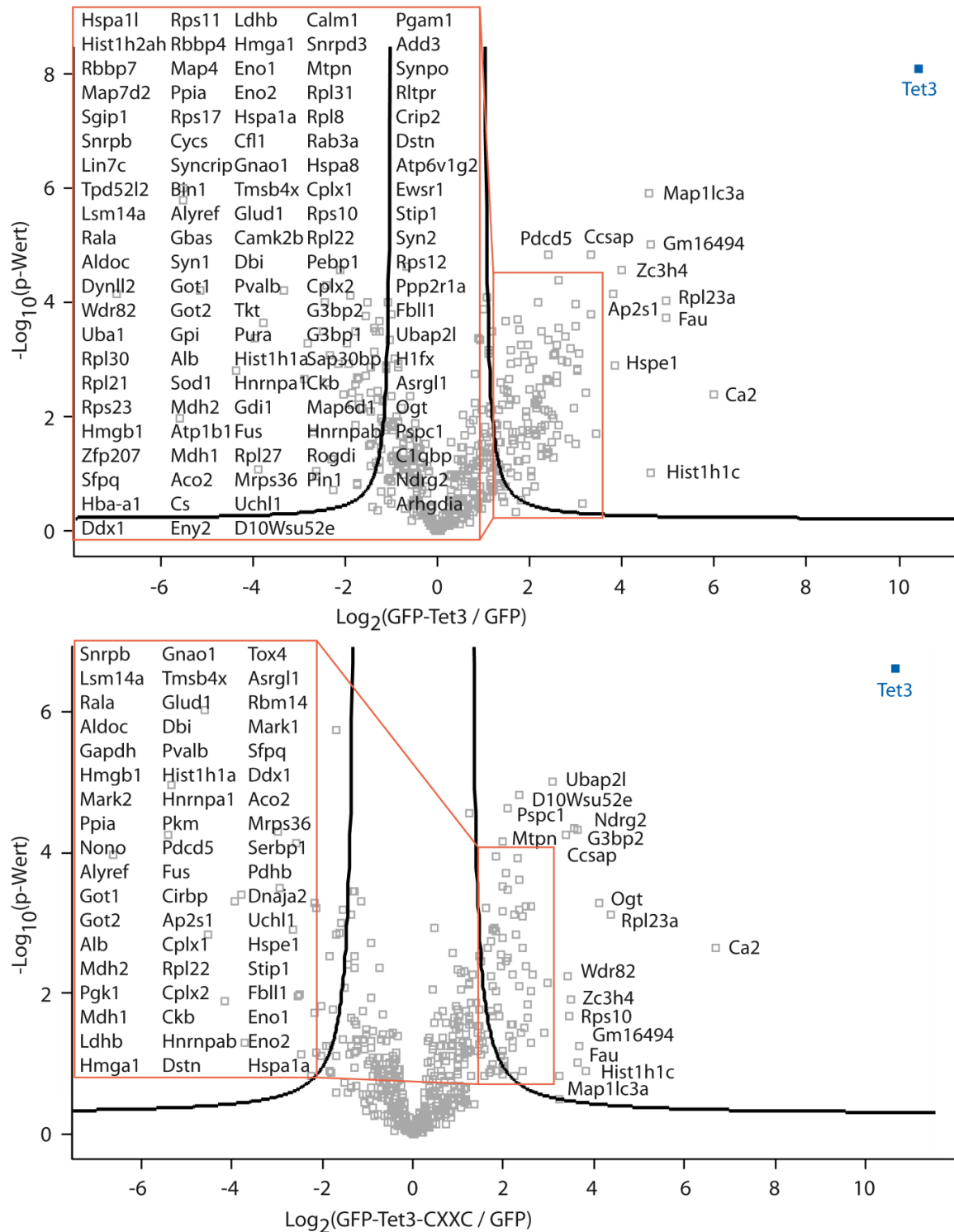


Abbildung 4.12: Volcano Plots der Co-Immunpräzipitationen mit Tet3 und Tet3^{-CXXC} im Vergleich zur GFP-Kontrolle im erwachsenen Gehirn von Mäusen ($s_0 = 2$; False Discovery Rate (FDR) = 0.05).

Besonders aufschlussreich ist die Detektion des bereits in Kapitel 4.1.1. identifizierten und bekannten Tet-Interaktors Ogt.^[238] Diese Beobachtung stellt eine Validierung der generierten Daten dar. Übereinstimmend mit früheren Studien^[48], wurden auch strukturelle und extrazelluläre Matrixproteine aufgrund ihrer Abundanz in den histologisch heterogenen Gehirnprouben identifiziert.

Abbildung 4.13A zeigt die *Volcano Plots* der Tet3- und Tet3^{-CXXC}-Interaktome fokussiert auf Interaktionspartner, die in der Lage sind, α -Ketoglutarat bereitzustellen. Hierbei wurden Proteine des Citratzyklus im Datensatz entdeckt. Die auf diese Weise identifizierten Enzyme Malatdehydrogenase (Mdh1/2), Citratsynthase (Cs) und Aconitase (Aco2) sind alle in der Biosynthese von α -Ketoglutarat aus Malat involviert. Wie in Abbildung 4.13B zu sehen, fehlt im Datensatz überraschenderweise das Protein Isocitratdehydrogenase (Idh). Dieses Enzym wird für die Umwandlung von Isocitrat in α -Ketoglutarat benötigt. Die Proteomik-Daten zeigen außerdem eine potentielle Assoziation von Tet3 mit den zwei Glutamat-Oxaloacetat-Transaminasen (Got1 und Got2), welche Aspartat in Oxaloacetat umwandeln. Sind diese identifizierten Proteine tatsächlich in der Gegenwart von Tet3 katalytisch aktiv, so würde dies folglich zu einer erhöhten lokalen Konzentration von Isocitrat in der Nähe von Tet3 führen (Abbildung 4.13B).

Zusätzlich konnte in dem Datensatz überraschenderweise das Enzym Glutamatdehydrogenase (Glud1) als potentieller Tet3-Interaktor entdeckt werden. Da Glud1 Glutamat zu α -Ketoglutarat desaminiert, könnte diese Interaktion eine direkte, Citratzyklus-unabhängige α -Ketoglutarat-Versorgung darstellen. Glutamat ist eine abundante Aminosäure und gleichzeitig ein Vermittler stimulierender Signale im zentralen Nervensystem von Wirbeltieren.^[411] Die Interaktion von Tet3 mit Glud1 könnte daher eine mögliche Verbindung zwischen neuraler Aktivität und der Oxidation von mC zu hmC sein.^[81-82]

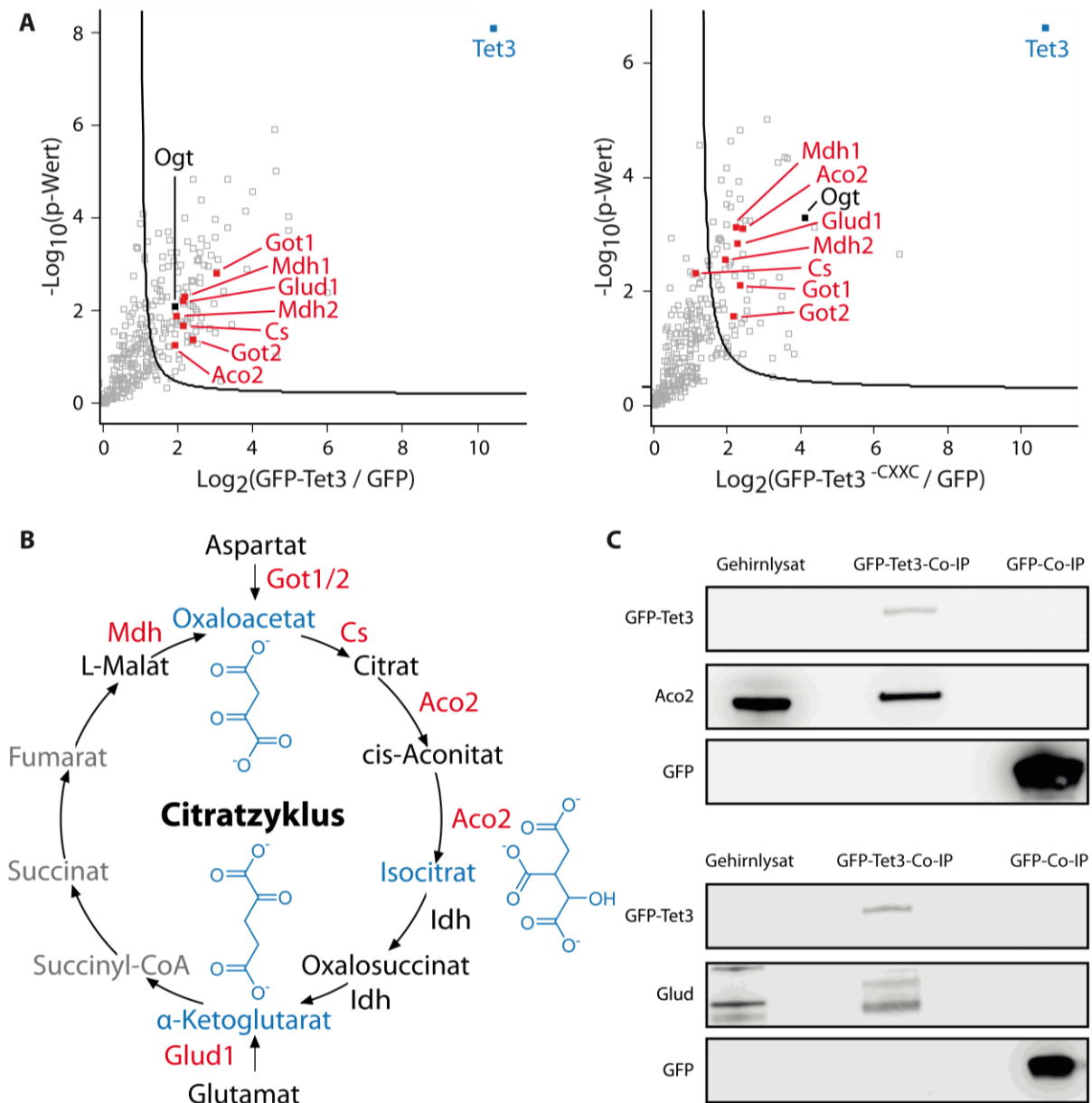


Abbildung 4.13: Tet3 interagiert mit Glud1, Got1/2 und Citratzyklusproteinen im Gehirn von Mäusen. (A) Diese metabolischen Enzyme sowie der bekannte Tet-Interaktor Ogt sind in den *Volcano Plots* der Co-Immunpräzipitationen (Co-IPs) mit Tet3 und Tet3^{CXXC} im erwachsenen Gehirn von Mäusen in rot beziehungsweise in schwarz markiert ($s_0 = 2$; *False Discovery Rate* (FDR) = 0.05). (B) Der Citratzyklus mit den Tet3-interagierenden Proteinen in rot markiert. Aco2 = Aconitase 2; Cs = Citratsynthase; Glud1 = Glutamatdehydrogenase 1; Got1/2 = Glutamatoxaloacetattransaminasen; Idh = Isocitratdehydrogenase; Mdh = Malatdehydrogenase. (C) *Western Blots* der Tet3-gesättigten Co-IPs unter Verwendung von Antikörpern gegen Aco2 und Glud. Die GFP-Co-IP dient als Negativkontrolle, das Gehirnlisat als Positivkontrolle.

4.1.2.2. Nachweis der Interaktionen und Lokalisation der Interaktoren

Zur Validierung der beobachteten Interaktionen, wurden Antikörper gegen Aco2 und Glud1 verwendet, um deren Vorhandensein auf den Tet3-beladenen Partikeln zu bestätigen. Hierzu wurden *Western Blots* durchgeführt, die in Abbildung 8.1A dargestellt sind. Abbildung 4.13C zeigt Ausschnitte aus diesen *Western Blots*, in denen die Banden der beiden Proteine deutlich in den Co-IPs mit GFP-Tet3 erkennbar sind. Als Positivkontrolle wurde Gehirnlisat und als Negativkontrolle die Co-IP mit GFP verwendet. Wie zu erwarten, konnte GFP nur in der Negativkontrolle und die beiden Enzyme Aco2 und Glud1 nur in der Positivkontrolle und in der GFP-Tet3-Co-IP detektiert werden. Folglich konnte nachgewiesen werden, dass Aco2 und Glud1 spezifisch in der Co-IP mit GFP-Tet3 angereichert sind.

Als nächstes wurde eine Co-IP von endogenem Tet3 mit Hilfe eines Anti-Tet3-Antikörpers unter Verwendung von Zellkernextrakt aus dem Gehirn erwachsener Mäuse durchgeführt. Die Spezifität des Antikörpers gegen Tet3 wurde durch vorherige Studien^[265] und einen *Western Blot* bestätigt. Das Ergebnis des *Western Blots* ist in Abbildung 4.14A und Abbildung 8.1B dargestellt.

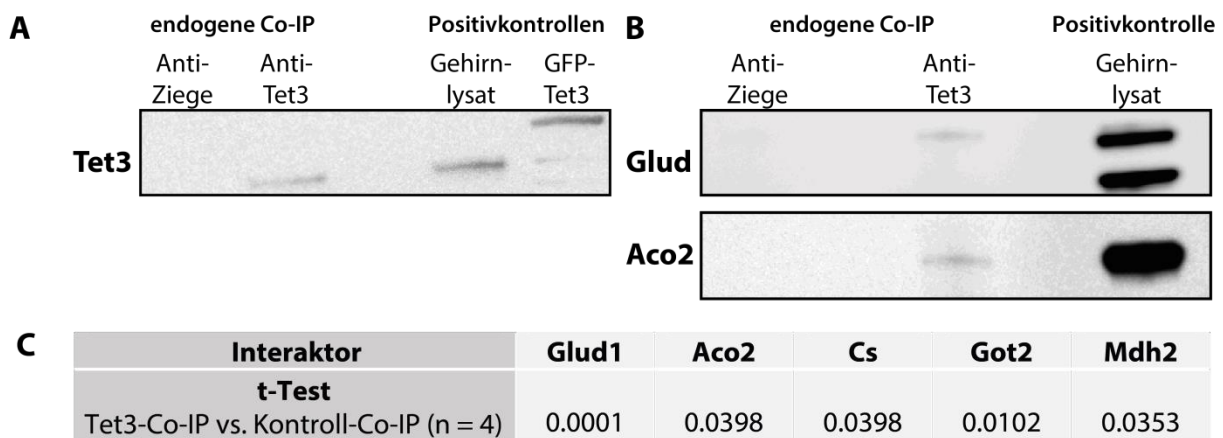


Abbildung 4.14: Validierung der Tet3-Interaktoren mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP). (A) Der *Western Blot* zeigt die Spezifität des Anti-Tet3-Antikörpers. (B) Der *Western Blot* der endogenen Tet3-Co-IP weist Glutamatdehydrogenase (Glud) und Aconitase 2 (Aco2) als Tet3-Interaktoren im Gehirn von Mäusen nach. (C) Massenspektrometrische Analyse bestätigt die signifikante Anreicherung von Glud1, Aco2, Citratsynthase (Cs), Glutamat-Oxaloacetat-Transaminase 2 (Got2) und Malatdehydrogenase 2 (Mdh2) in der endogenen Tet3-Co-IP im Vergleich zur Kontroll-Co-IP mit Anti-Ziege-IgG-Antikörper.

Anschließend wurde die Interaktion des endogenen Tet3 mit Glud1 und Aco2 in einem *Western Blot* nachgewiesen, der in Abbildung 4.14B und Abbildung 8.1B zusammengefasst ist. Auch eine Analyse der mit Tet3 co-präzipitierten Proteine mittels Massenspektrometrie und LFQ bestätigte die

Anwesenheit der bereits identifizierten α -Ketoglutarat-Biosynthese-Enzyme Glud1, Aco2, Cs, Got2 und Mdh2. Abbildung 4.14C lässt erkennen, dass diese Proteine signifikant in der endogenen Tet3-Co-IP gegenüber der Kontrolle angereichert waren. Die Enzyme Got1 und Mdh1 wurden ebenfalls in dem Datensatz identifiziert, waren jedoch mit einem jeweiligen p-Wert von 0.0978 beziehungsweise 0.1418 nicht signifikant angereichert.

Des Weiteren wurde die Interaktion von Glud1, Aco2 und Got2 mit Tet3 direkt in den Zellkernen von Gehirnzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden IHC-Experimente und PLAs^[412] durchgeführt. Aufgrund ihres hohen hmC-Gehalts, wurden Hippocampi von Mäusen für diese Versuche verwendet. Zuerst wurden die Anti-Tet3-Antikörper auf unspezifische Interaktionen hin in Tet-defizienten mESCs untersucht. Wie in Abbildung 8.2A zu erkennen, konnten für die angewendeten Konzentrationen keine unspezifischen Signale detektiert werden. Abbildungen 4.15A und 8.2B zeigen, dass in den histologischen Schnitten des Hippocampus eine klare Lokalisation von Tet3 und Glud1 im Zellkern festgestellt werden konnte. Die Beobachtung, dass Glud1 im Zellkern vorkommt, ist überraschend, da es als mitochondriales Protein bekannt ist. Auch für das mitochondriale Enzym Aco2 konnte eine Lokalisation im Zellkern festgestellt werden, wie in Abbildungen 4.15A und 8.2B zu sehen. Am wichtigsten sind jedoch die PLA-Daten, die für alle drei Proteine, Glud1, Aco2 und Got2, jeweils eine direkte Interaktion mit Tet3 bestätigen. Abbildung 4.15B zeigt die Ergebnisse der PLA-Experimente. Deutlich zu erkennen ist, dass zahlreiche PLA-Signale für die Tet3-Glud1-Interaktion detektiert werden konnten. Positive Signale konnten auch für Tet3 und Aco2 sowie für Tet3 und Got2 festgestellt werden. Keine Signale konnten dagegen in dem entsprechenden Negativkontroll-Experiment nachgewiesen werden. Ein Positivkontroll-Experiment mit dem bekannten Tet-Interaktor Ogt lieferte im Vergleich zu Glud1 eine ähnliche Anzahl an Signalen.

Zusammenfassend zeigen die Co-IP- und PLA-Daten, dass Tet3 im Hippocampus mit den Enzymen Aco2, Cs, Mdh2 und Got2 assoziiert ist. Besonders starke Signale wurden für Glud1 detektiert. Diese Beobachtung bestärkt die Möglichkeit, dass die Oxidation von mC zu hmC in Gehirnzellen mit α -Ketoglutarat durchgeführt wird, welches aus der Neurotransmitter-Aminosäure Glutamat hergestellt wird.

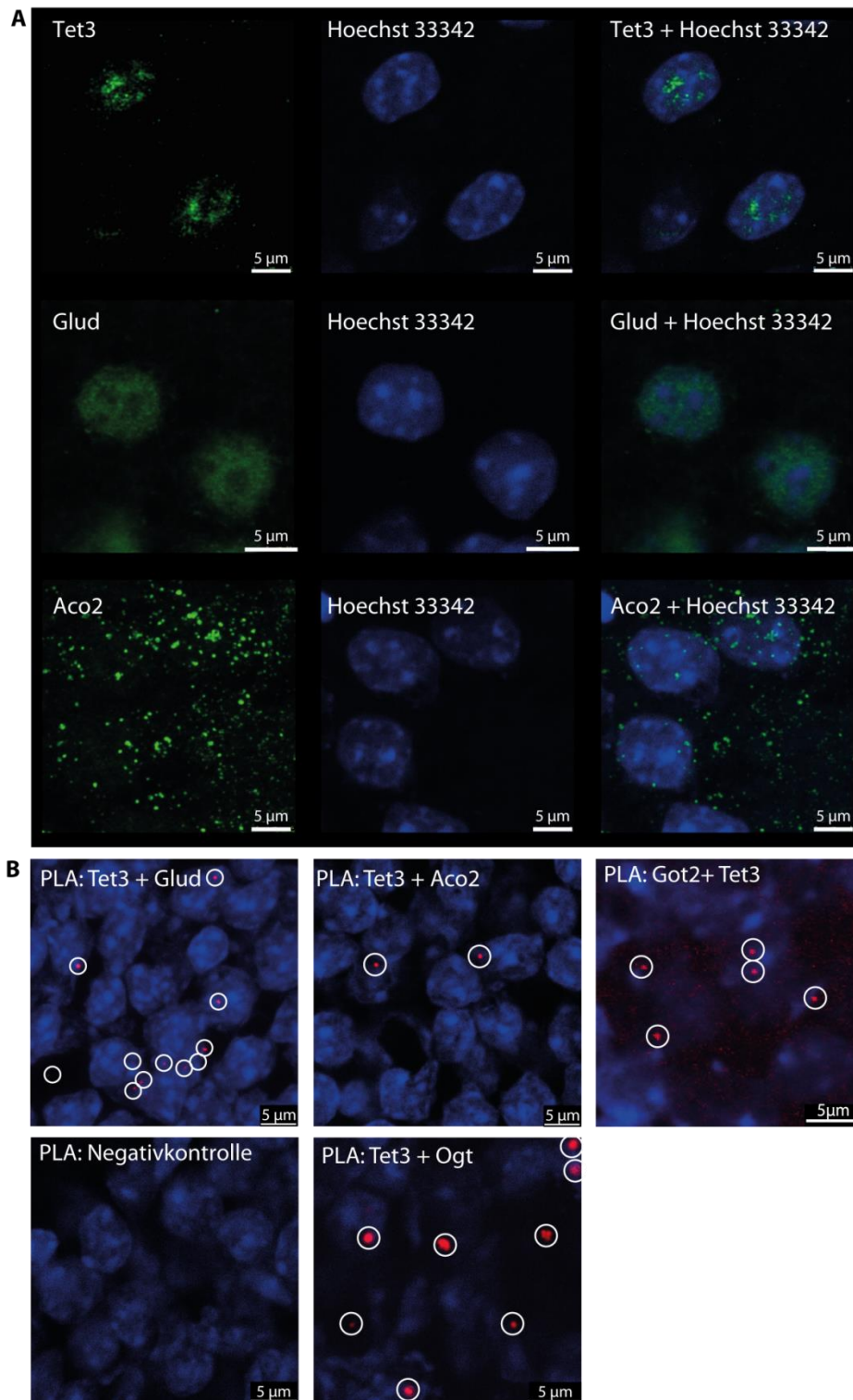


Abbildung 4.15: Lokalisation und Validierung der Tet3-Interaktoren mittels Immunhistochemie (IHC) und Proximity Ligation Assay (PLA). (A) IHC von Tet3, Glutamatdehydrogenase 1 (Glud1) und Aconitase 2 (Aco2) im Hippocampus von Mäusen zeigt, dass Tet3 und Glud1 im Zellkern lokalisiert sind. Aco2 ist hauptsächlich in den Mitochondrien vorhanden. (B) *In situ* PLAs zeigen die direkte Interaktion zwischen Glud1/Tet3 und Aco2/Tet3 in Hippocampus-Zellkernen von Mäusen durch ein rotes Signal, das zur besseren Sichtbarkeit weiß umrandet ist. Der Tet3/Ogt-PLA diente als Positivkontrolle. Für die Negativkontrolle wurden keine Primärantikörper verwendet.

4.1.2.3. Funktionelle Untersuchung der Interaktion von Glud1 mit Tet3

Zur Erforschung des funktionellen Zusammenhangs zwischen Glud1 und Tet3, wurden nur die katalytische Domäne (Tet3CD) oder das komplette Tet3-Protein (Tet3FL) zusammen mit Glud1 in HEK293T-Zellen produziert. Eine Übersicht über die verwendeten Tet-Konstrukte ist in Abbildung 4.16A illustriert. Die katalytische Domäne von Tet3 besteht aus einer Cystein-reichen Region (Cys) und einer DSBH-Region, die α -Ketoglutarat bindet.

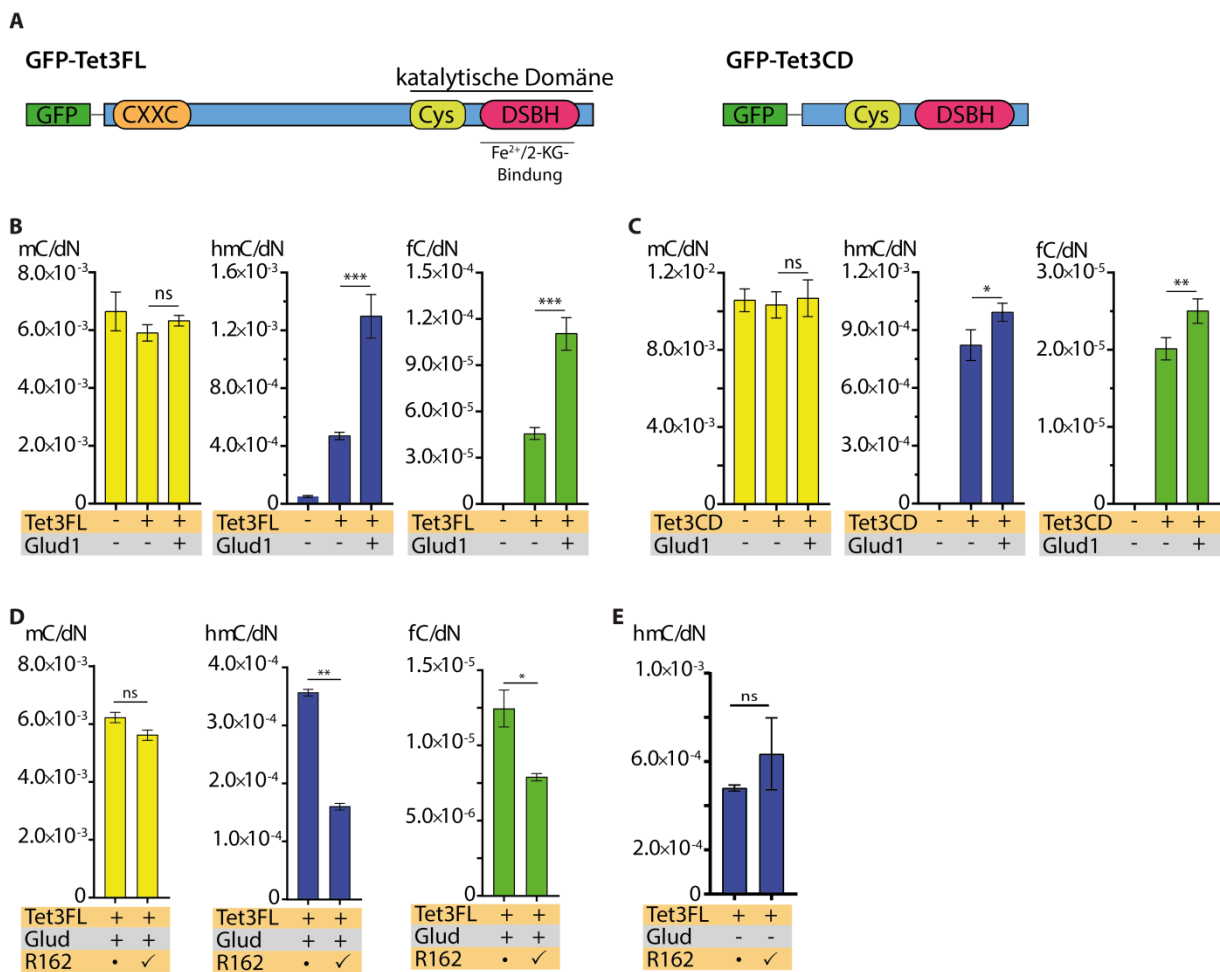


Abbildung 4.16: Funktionelle Interaktion von Glud1 mit Tet3. (A) Schematische Repräsentation des mit GFP fusioniertem Volllängenkonstrukts (GFP-Tet3FL) und der katalytischen Domäne von Tet3 (GFP-Tet3CD). (B-E) +: transfiziert, -: untransfiziert, ✓: Zugabe, •: keine Zugabe. (B-C) HEK293T-Zellen wurden jeweils mit GFP-Tet3FL oder GFP-Tet3CD und Glutamatdehydrogenase (Glud1) co-transfiziert. Untransfizierte Zellen dienten als zusätzliche Kontrollen. (D) HEK293T-Zellen wurden mit GFP-Tet3FL sowie Glud1 co-transfiziert und mit 20 μ M Glud1-Inhibitor R162 gefüttert. (E) HEK293T-Zellen, die nur Tet3 (+ - •/+ - ✓) produzierten, dienten als Kontrolle. Diese zeigt, dass R162 nicht die Tet3-Aktivität vermindert. Alle Messungen wurden in biologischen und technischen Duplikaten durchgeführt (n = 2 für ungepaarten t-Test). ns = nicht signifikant; p-Werte *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für (B-E).

Die DNA aus den Co-Expressions-Zellen wurde zuerst isoliert und anschließend wurden die Level an mC, hmC und fC mittels UHPLC-MS/MS quantifiziert.^[116] Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 4.16B und 4.16C dargestellt. In allen Experimenten konnte festgestellt werden, dass die mC-Level im Wesentlichen unverändert blieben. Für hmC und fC hingegen wurden signifikante Unterschiede gemessen (ungepaarter t-Test, Anzahl (n) = 3 für Tet3FL, n = 3 für Tet3FL+Glud1, p-Wert = 0.0006 für hmC und p-Wert = 0.0007 für fC). Eine nahezu dreifache Erhöhung der hmC- und fC-Level ist in HEK293T-Zellen zu sehen, in denen Tet3FL und Glud1 co-exprimiert wurden. Der Effekt ist mit einer Steigerung von nur 15% sehr viel geringer, aber dennoch signifikant, wenn nur die C-terminale katalytische Domäne Tet3CD mit Glud1 co-exprimiert wurde (ungepaarter t-Test, n = 3 für Tet3CD, n = 3 für Tet3CD+Glud1, p-Wert = 0.0229 für hmC und p-Wert = 0.0077 für fC). Die Daten weisen folglich darauf hin, dass Glud1 funktionell mit Tet3FL interagiert und dass es die Tet3-Aktivität stark stimuliert.

Um zu zeigen, dass die Tet3-Stimulation durch die katalytische Aktivität und nicht durch die bloße Anwesenheit von Glud1 verursacht wird, wurde der Glud1-Inhibitor R162^[413] zu dem Experiment hinzugegeben. In Abbildung 4.16D und 4.16E ist deutlich zu erkennen, dass der Inhibitor tatsächlich den stimulierenden Effekt reduzierte.

Eine ähnliche Situation wurde in Experimenten mit Tet1 und Tet2 beobachtet, die in Abbildung 4.17 dargestellt sind. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Glud1 nicht nur Tet3 mit α -Ketoglutarat versorgen kann, sondern auch Tet1 und Tet2.

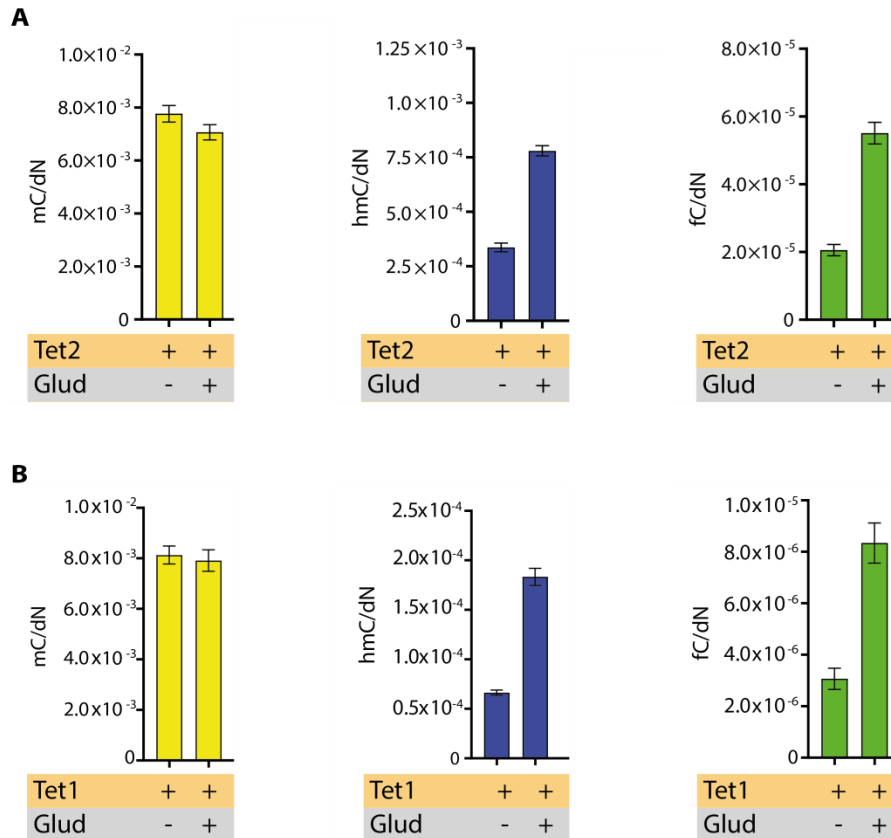


Abbildung 4.17: Co-Transfektion von Glutamatdehydrogenase (Glud1) und Tet1/Tet2 in HEK293T-Zellen. HEK293T-Zellen wurden jeweils mit Glud1 und GFP-Tet2 (A) oder GFP-Tet1 (B) co-transfiziert. Globale mC-, hmC- und fC-Level wurden miteinander verglichen. Die Messungen wurden jeweils in biologischen und technischen Triplikaten durchgeführt (n = 3 für ungepaarten t-Test).

Um physiologisch relevantere Belege für die Glud1-basierte Tet3-Stimulation zu erhalten, wurden als nächstes die hmC-Level in Hippocampus-Schnitten von Mäusen (n = 3) mit und ohne KCl-induzierter neuronaler Depolarisation (25 mM gegenüber 3 mM KCl, für 6 Stunden) analysiert. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 4.18 illustriert. Während die mC-Level unverändert blieben, konnte beobachtet werden, dass die hmC-Level signifikant stiegen, wenn die Neuronen mit 25 mM KCl depolarisiert wurden (einfache ANOVA Tukey's multipler Vergleichstest, p-Wert = 0.0255). Dieser hmC-steigernde Effekt konnte wieder mit dem Glud1-Inhibitor R162 blockiert werden (einfache ANOVA Tukey's multipler Vergleichstest, p-Wert = 0.0497). Folglich wird die katalytische Aktivität von Glud1 gebraucht, um die hmC-Level als Antwort auf die neuronale Depolarisierung zu erhöhen. Diese Schlussfolgerung ist übereinstimmend mit der Idee, dass α -Ketoglutarat ratenlimitierend ist. ^[410, 338]

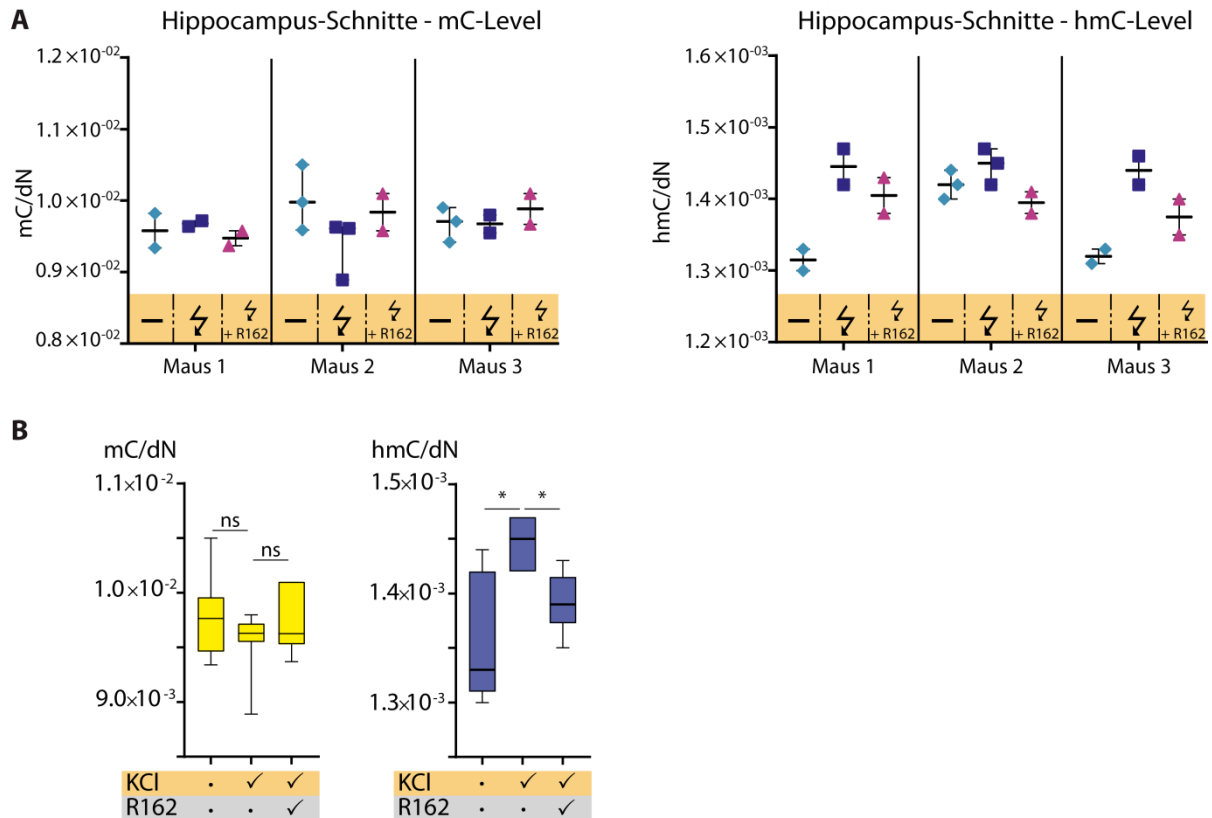


Abbildung 4.18: Depolarisierung von Hippocampus-Neuronen. (A) Hippocampus-Neuronen wurden in 25 mM KCl-Puffer mit und ohne 20 μ M R162 depolarisiert. Neuronen in physiologischem Puffer dienten als Kontrolle. mC- und hmC-Level für jede Maus und jede Bedingung sind in technischen Replikaten gezeigt. Whiskers stellen den minimalen und maximalen Wert dar; die Bande zeigt den Median an. -: physiologische Pufferbedingungen, ⚡ : physiologischer Puffer und 25 mM KCl, ⚡ + R162: physiologischer Puffer und 25 mM KCl und 20 μ M R162. (B) Die Ergebnisse aus (A) in Boxplots dargestellt. ✓: Zugabe; •: keine Zugabe; ns = nicht signifikant; *: p-Wert < 0.05.

4.1.2.4. Wirkung der Citratzyklus-Intermediate auf die Tet3-Aktivität

Die beobachtete Assoziation von Tet3 mit Mdh, Got1/2, Cs und Aco in Abwesenheit von Idh weist auf eine Akkumulation von Isocitrat und zum Teil von Oxaloacetat in nächster Nähe zu Tet3 hin. Um zu untersuchen, wie diese Metaboliten die Tet3-Aktivität beeinflussen könnten, wurden GFP-Tet3-beladene Agarosepartikel mit mC-enthaltender DNA inkubiert. Das Experiment wurde in einem Puffersystem mit Ascorbinsäure und DTT durchgeführt, um das Eisen im aktiven Fe^{2+} -Zustand zu halten. Abbildung 4.19A skizziert den Versuchsablauf sowie die verwendeten Oligonukleotide und Reagenzien.

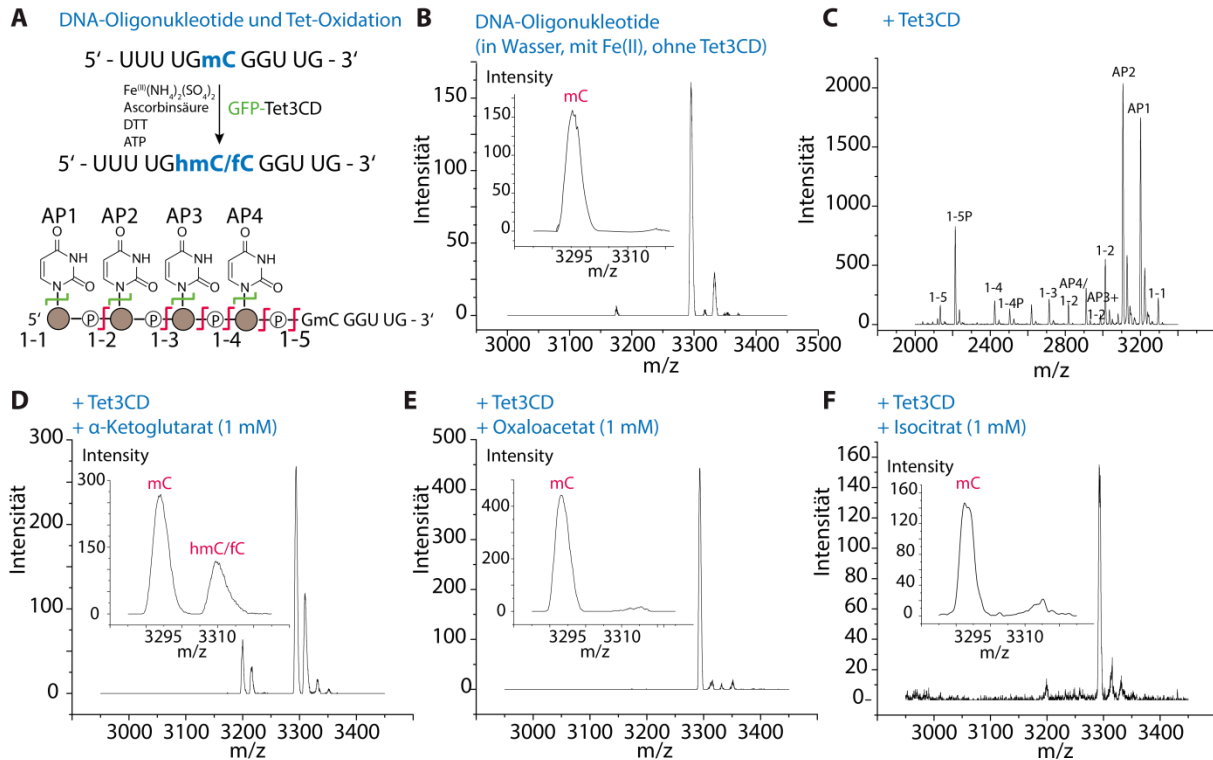


Abbildung 4.19: Die Tet-Aktivität wird durch Metaboliten beeinflusst. (A) DNA-Oligonukleotide, Degradationswege (AP = *abasic site*) und Pufferbestandteile für *in-vitro*-Aktivitätstests. (B-F) Metaboliten schützen mC-enthaltende DNA vor Tet3-induzierter Zersetzung. MALDI-TOF-Analysen zeigen Peaks für mC- (3294.5 m/z) und hmC/fC-enthaltende DNA (3310.8 m/z).

Während sich das DNA-Oligonukleotid (Abbildung 4.19A 1-1) unter diesen Bedingungen in Wasser stabil verhält, zeigt die MALDI-TOF-Analyse in Abbildung 4.19C überraschenderweise eine starke Degradation des Oligonukleotids bei Zugabe von Tet3CD ohne α-Ketoglutarat. In Abbildung 8.3 deutlich zu erkennen, konnte diese Degradation auch für andere Tet-Enzyme und DNA-Sequenzen beobachtet werden. Für eingehendere Analysen der Degradationsreaktion wurde ein Oligonukleotid verwendet, in dem die T-Basen durch Uracil (U) ersetzt wurden, um ebenfalls die Detektion von mC-Deaminierungsreaktionen zu ermöglichen. Die Versuche zeigten vorwiegend eine Hydrolyse der Phosphodiester und eine Spaltung glykosidischer Bindungen. Diese Degradationswege können mit der bekannten Chemie von *high-spin* Fe²⁺-Zentren erklärt werden. Diese Zentren bilden die reaktiven Zentren in aktiven Tet-Enzymen und sind Lewis-sauer. Dies verursacht Phosphodiester-Hydrolyse^[414] und Redoxaktivität, welche die beobachtete Spaltung der glykosidischen Bindung erklären kann.^[415-416]

Wurde α-Ketoglutarat zum Experiment hinzugefügt, wurde die DNA-Degradation komplett gestoppt. In Abbildung 4.19D deutlich zu erkennen, konnte stattdessen die erwartete Oxidation von mC zu hmC und fC detektiert werden. Die Beobachtung der DNA-Degradation in Abwesenheit von α-Ketoglutarat

bestätigt, dass das reaktive Fe^{2+} -Zentrum eine vollständige Koordinierung benötigt, um mögliche DNA-Schäden zu verhindern.^[417-419] Es ist nicht klar, welche Moleküle das Fe^{2+} -Zentrum in Abwesenheit von α -Ketoglutarat *in vivo* koordinieren, wenn das Enzym in einem inaktiven Zustand ist, doch man könnte spekulieren, dass die Citratzyklus-Metaboliten involviert sind.

Tatsächlich wurde durch das Ersetzen von α -Ketoglutarat durch Oxaloacetat (Abbildung 4.19E) oder Isocitrat (Abbildung 4.19F) in den Experimenten, in beiden Fällen weder eine Oxidation von mC, noch eine DNA-Degradation detektiert. Abbildung 4.20A zeigt die Ergebnisse einer Ligand-Docking-Simulation mit der Kristallstruktur der katalytischen Domäne von Tet2 (PDB ID: 4NM6) mittels Maestro 10.7. Die Berechnung der in Abbildung 4.20B aufgelisteten *Docking Scores* der verschiedenen Metaboliten bestätigt, dass Oxaloacetat und Isocitrat in die katalytische Tasche des Enzyms passen.

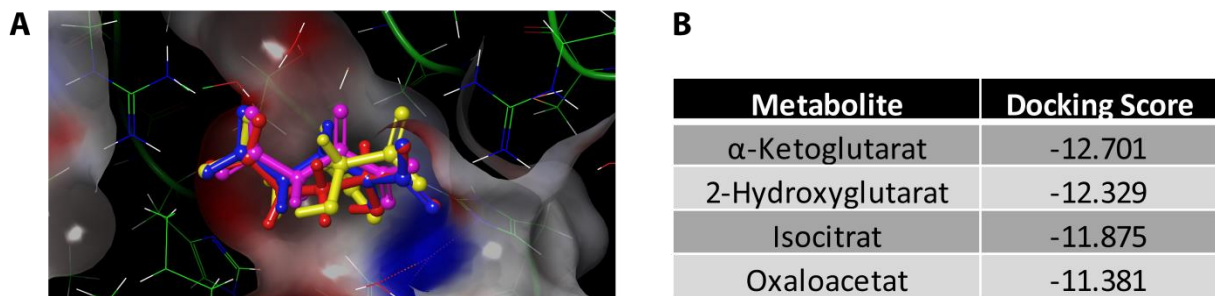


Abbildung 4.20: Berechnung der *Docking Scores* für verschiedene Metaboliten in die katalytische Tasche von Tet2 (PDB ID: 4NM6). Unterschiedliche Metaboliten wurden mit Hilfe von Maestro 10.7 mit den Standardeinstellungen (*Glide Ligand Docking*) in die katalytische Domäne von Tet2 modelliert. (A) α -Ketoglutarat (blau), 2-Hydroxyglutarat (rot), Isocitrat (gelb) und Oxaloacetat (violett) passen in die Bindungstasche. (B) Die *Docking Scores* der verschiedenen Metabolite. Je niedriger der *Score*, desto besser passt der Ligand in die Bindungstasche.

Falls diese Metaboliten in die aktive Tasche binden, müsste dies einen kompetitiv inhibitorischen Effekt haben. Um dies zu untersuchen, wurden zunehmende Mengen der beiden Metaboliten Oxaloacetat und Isocitrat zu einer Lösung zugegeben, welche die Tet3-beladenen Partikel, die mC-enthaltenden Oligonukleotide und 1 mM α -Ketoglutarat enthielt. Die Ergebnisse in Abbildung 4.21 zeigen, dass tatsächlich ein inhibitorischer Effekt für die beiden Metaboliten bei millimolaren Konzentrationen festgestellt werden konnte. Die beobachtete inhibitorische Wirkung von Oxaloacetat und Isocitrat ähnelt den bereits beschriebenen Inhibitoreffekten von 2-Hydroxyglutarat^[109] sowie von Succinat und Fumarat.^[420]

4. Ergebnisse und Diskussion

A

Inhibitor	-	Oxaloacetat		Isocitrat	
		10 mM	100 mM	10 mM	100 mM
mC	0 %	79.2 %	100 %	14.7 %	86.6 %
hmC/fC	100 %	20.8 %	0 %	85.3 %	13.4 %

B

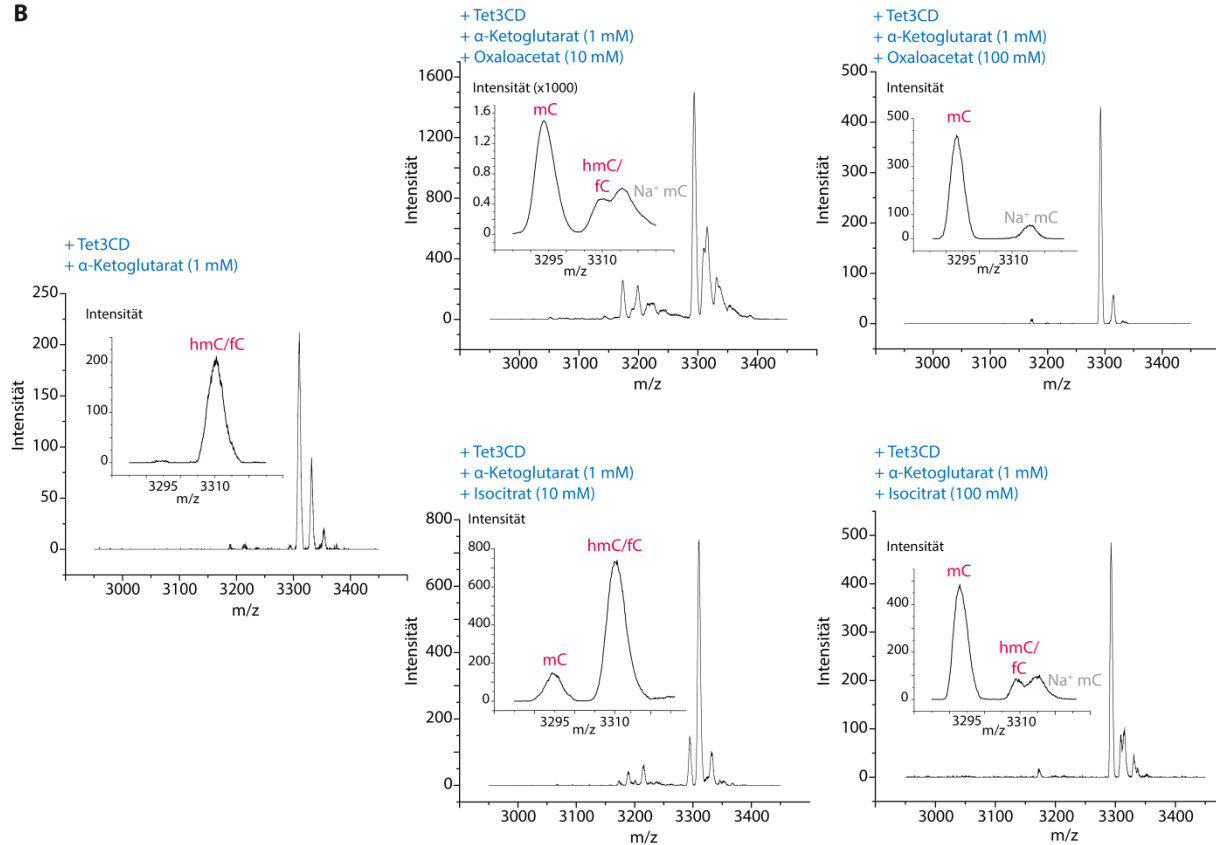


Abbildung 4.21: Oxaloacetat und Isocitrat reduzieren die Tet3-Aktivität. (A) Oxaloacetat und Isocitrat vermindern die Tet3-Aktivität *in vitro*. (B) MALDI-TOF-Spektren der *in-vitro*-Aktivitätstests mit der katalytischen Domäne von Tet3 (Tet3CD). Der Substrat-Peak (mC) wurde bei einer Größe von 3294.5 Da, der Produkt-Peak (hmC/fC) bei 3310 Da erwartet. Peaks bei m/z 3315 stellen Na⁺-Addukte des originalen Substrats dar.

Als nächstes wurde untersucht, ob Isocitrat oder Oxaloacetat die Oxidation von mC zu hmC *in cellulo* beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden HEK293T-Zellen mit Tet3FL transfiziert und vier Stunden nach der Transfektion wurde dem Medium 10 mM Isocitrat oder Oxaloacetat zugegeben. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Level von mC, hmC, fC und caC analysiert. Die in Abbildung 4.22 dargestellte Analyse ergab in Anwesenheit von Isocitrat eine signifikante Reduktion der hmC- und caC-Werte (ungepaarter t-Test, n = 3, p-Wert = 0.0480 für hmC und p-Wert = 0.0493 für caC), wohingegen die mC-Level unverändert blieben.

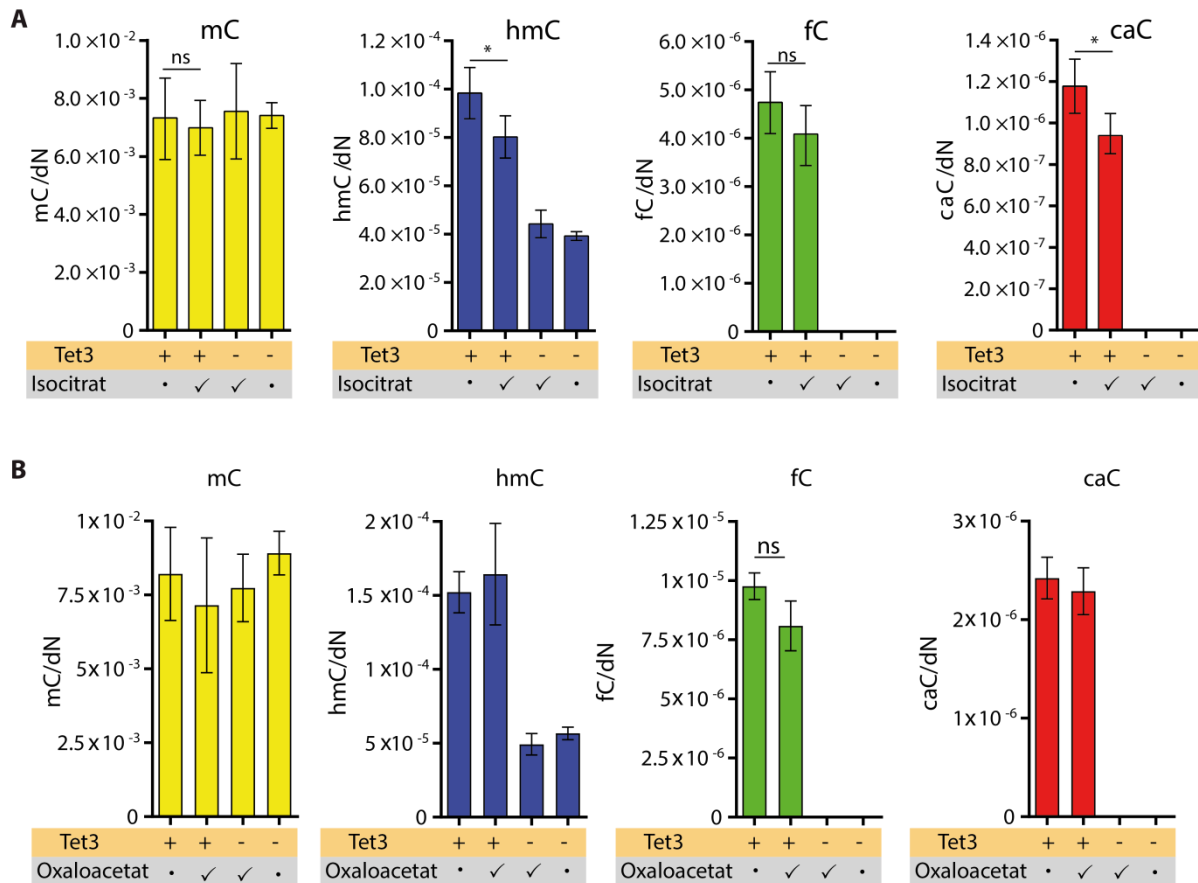


Abbildung 4.22: Oxaloacetat- und Isocitrat-Fütterung von Tet3-transfizierten HEK293T-Zellen. (A) HEK293T-Zellen wurden mit Tet3 transfiziert und mit 10 mM Oxaloacetat gefüttert (+ ✓). Globale mC-, hmC-, fC- und caC-Level wurden mit transfizierten, jedoch nicht mit Oxaloacetat gefütterten (+ •) Zellen verglichen. Untransfizierte Zellen, die entweder mit Oxaloacetat gefüttert wurden (- ✓) oder nicht (- •), dienten als zusätzliche Kontrollen. (B) Isocitrat reduziert die Tet3-Aktivität in HEK293T-Zellen, die mit GFP-Tet3 transfiziert wurden und mit 10 mM Isocitrat gefüttert wurden (+ ✓). Als Kontrollen dienten transfizierte Zellen, die nicht mit Isocitrat gefüttert wurden (+ •), und untransfizierte Zellen, welche entweder mit Isocitrat gefüttert wurden (- ✓) oder nicht (- •). ns = nicht signifikant; ungepaarter t-Test (n = 3) *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.1.2.5. Diskussion

Tet-Enzyme oxidieren mC zu hmC, fC und caC im Zellkern. Für diese Reaktion brauchen sie Sauerstoff und α -Ketoglutarat als essentielle Cosubstrate.^[58-59, 118, 60] α -Ketoglutarat ist ein Intermediat des Citratzyklus und wird somit hauptsächlich im Mitochondrium gebildet. Die unterschiedliche Lokalisation der Enzyme und des Cosubstrats verursacht ein Versorgungsproblem. Einige aktuelle Studien zeigen außerdem, dass die α -Ketoglutarat-Versorgung ratenlimitierend für die Tet-Oxidation ist.^[410, 338] In dieser Studie konnte mit Daten aus Proteomik-Experimenten, endogener Co-IP und PLA

nachgewiesen werden, dass Tet3 direkt mit einigen der, in die α -Ketoglutarat-Biosynthese involvierten, Schlüsselenzyme des Citratzyklus im Zellkern von Neuronen assoziiert ist. Überdies wurden Interaktionen von Tet3 mit Got1/2 und Glud1 entdeckt. Glud1 nutzt NAD^+ , um Glutamat direkt in α -Ketoglutarat zu verwandeln. Glutamat ist ein wichtiger Neurotransmitter und glutamaterge Neuronen sind für ihre synaptische Plastizität bekannt, die wiederum ein bekannter Auslöser für Veränderungen der hmC-Level ist.^[82] Obwohl Glutamat eine abundante Aminosäure ist, könnte spekuliert werden, dass die direkte Glud1-Tet3-Interaktion einen funktionellen Zusammenhang zwischen Gehirnfunktion und Epigenetik herstellt. Es konnte im Rahmen dieser Studie nachgewiesen werden, dass Glud1 und Tet3 direkt miteinander assoziiert sind. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Interaktion zu einer erheblichen Erhöhung der hmC-Level führt und demzufolge die Tet3-Aktivität stimuliert. Die Experimente mit dem Glud1-Inhibitor R162 weisen darauf hin, dass diese Beeinflussung durch die direkte Biosynthese von α -Ketoglutarat nahe dem aktiven Zentrum von Tet3 verursacht wird. Dies führt zu einer stark erhöhten effektiven Molarität des Cosubstrats. Wenn α -Ketoglutarat ratenlimitierend ist^[410, 338], stellt sich die Frage, was in das reaktive Fe^{2+} -Zentrum in Abwesenheit von α -Ketoglutarat bindet. Es konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit eines potentiellen Liganden das Fe^{2+} -Zentrum die Tendenz hat, DNA zu degradieren. Dieser Effekt ist in Anwesenheit von Oxaloacetat und Isocitrat komplett gestoppt. Oxaloacetat und Isocitrat sind die Biosynthese-Intermediate, welche von Got2 und den anderen Citratzyklusproteinen, die mit Tet3 assoziiert gefunden wurden, generiert werden. Obwohl nicht untersucht werden konnte, welcher Ligand in Abwesenheit von α -Ketoglutarat das Fe^{2+} -Zentrum *in vivo* besetzt, ist es denkbar, dass diese Citratzyklus-Intermediate mit ihrer, dem α -Ketoglutarat ähnlichen, chemischen Struktur die nötige schützende Funktion bieten.

Autorenbeiträge

Die Experimente wurden zusammen mit Franziska Traube, Stylianos Michalakis, Markus Müller und Thomas Carell entworfen. In Zusammenarbeit mit Franziska Traube wurden die endogenen Co-IPs, die *Western Blots*, die IHC, die PLAs und die Datenauswertung durchgeführt. Edris Parsa entwickelte das Expressionsprotokoll in HEK293T-Zellen. Franziska Traube führte die Co-Transfektionsexperimente und die Isocitratfütterung aus. Die *in-vitro*-Aktivitätstests wurden von Franziska Traube, Edris Parsa und Thomas Wildenhof durchgeführt. Anna Geserich und Stylianos Michalakis halfen bei der Durchführung und Analyse der IHC- und PLA-Experimente. René Rahimoff synthetisierte R162. Constanze Scheel, Victoria Splith und Stylianos Michalakis führten die Depolarisation der Hippocampus-Neuronen durch. Franziska Traube, Angie Kirchner und Katharina Iwan isolierten DNA

und analysierten die Proben mit Hilfe eines Triple-Quadrupols. Michael Stadlmeier half bei den massenspektrometrischen Messungen. Die Mäuse für die Studie wurden von Stylianos Michalakis bereitgestellt. Ergebnisse wurden zusammen mit Markus Müller und Fabio Spada diskutiert und interpretiert. Jürgen Cox half bei der statistischen Analyse der Proteomik-Daten. Thomas Carell entwickelte und betreute die Studie und interpretierte Daten. Das Manuskript wurde zusammen mit Franziska Traube und Thomas Carell geschrieben.

4.1.3. Tet3 wird von REST für kontext-spezifische Hydroxymethylierung und Induktion der Genexpression rekrutiert

A. Perera[#], D. Eisen[#], M. Wagner[#], S. K. Laube, **A. F. Künzel**, S. Koch, J. Steinbacher, E. Schulze, V. Splith, N. Mittermeier, M. Müller, M. Biel, T. Carell, S. Michalakis, *Cell Rep* **2015**, *11*, 283-294.

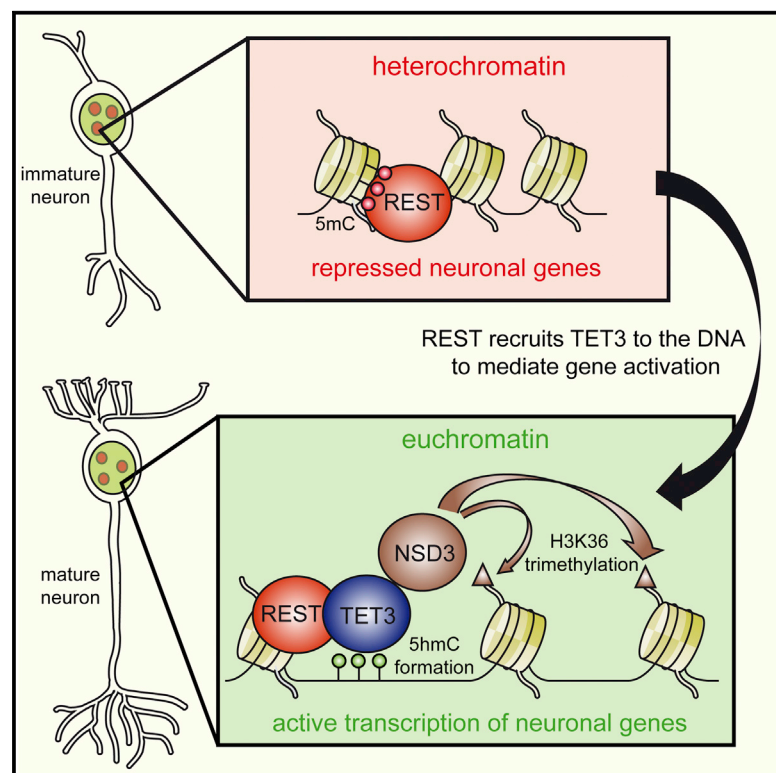
[#]Co-first authors

Dieses Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Stylianos Michalakis untersucht die Tet-Aktivität und hmC-Level in der Retina von Mäusen. Hierbei war von besonderem Interesse, wie die neuronale Tet3-Isoform, der die CXXC-Domäne fehlt (Tet3^{-CXXC}), zur DNA rekrutiert wird. Durch Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsrepressor REST mit Tet3 interagiert und die Tet3-Aktivität erhöht. REST bringt Tet3 gezielt zur DNA, um eine kontext-spezifische Hydroxymethylierung und somit eine Aktivierung der Gentranskription zu bewirken. Ferner induziert Tet3 die Histon3-Lysin36-Trimethylierung (H3K36me3), indem es mit H3K36-Methyltransferasen wie NSD3 interagiert. Diese Enzyme wirken durch ihre Fähigkeit zur Chromatinumstrukturierung ebenfalls transkriptionsaktivierend.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die LFQ-Proteomik-Experimente für diese Publikation durchgeführt.

TET3 Is Recruited by REST for Context-Specific Hydroxymethylation and Induction of Gene Expression

Graphical Abstract



Authors

Arshan Perera, David Eisen, ..., Thomas Carell, Stylianos Michalakis

Correspondence

thomas.carell@cup.uni-muenchen.de (T.C.),
stylianos.michalakis@cup.uni-muenchen.de (S.M.)

In Brief

Neuronal differentiation involves major epigenetic changes, such as accumulation of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC). Perera et al. found that TET3 interacts with transcriptional regulators and histone writers. They demonstrate that REST recruits TET3 for context-specific 5hmC formation and TET3 recruits NSD3 for H3K36 trimethylation.

Highlights

- TET3 interacts with transcriptional regulators and histone writers
- REST recruits TET3 and stimulates its hydroxylase activity
- TET3 activates context-specific gene transcription
- TET3 enhances the activity of NSD3 to generate H3K36 trimethylation

Accession Numbers

GSE65860
PXD001857

TET3 Is Recruited by REST for Context-Specific Hydroxymethylation and Induction of Gene Expression

Arshan Perera,^{1,3} David Eisen,^{2,3} Mirko Wagner,^{2,3} Silvia K. Laube,² Andrea F. Künzel,² Susanne Koch,¹ Jessica Steinbacher,² Elisabeth Schulze,¹ Victoria Splith,¹ Nana Mittermeier,¹ Markus Müller,² Martin Biel,¹ Thomas Carell,^{2,*} and Stylianos Michalakis^{1,*}

¹Center for Integrated Protein Science Munich CiPSM at the Department of Pharmacy – Center for Drug Research, Ludwig-Maximilians-Universität München, 81377 Munich, Germany

²Center for Integrated Protein Science Munich CiPSM at the Department of Chemistry, Ludwig-Maximilians-Universität München, 81377 Munich, Germany

³Co-first author

*Correspondence: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de (T.C.), stylianos.michalakis@cup.uni-muenchen.de (S.M.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.020>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

SUMMARY

Ten-eleven translocation hydroxylases (TET1-3) oxidize 5-methylcytosine (5mC) to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC). In neurons, increased 5hmC levels within gene bodies correlate positively with gene expression. The mechanisms controlling TET activity and 5hmC levels are poorly understood. In particular, it is not known how the neuronal TET3 isoform lacking a DNA-binding domain is targeted to the DNA. To identify factors binding to TET3, we screened for proteins that co-precipitate with TET3 from mouse retina and identified the transcriptional repressor REST as a highly enriched TET3-specific interactor. REST was able to enhance TET3 hydroxylase activity after co-expression and overexpression of TET3-activated transcription of REST target genes. Moreover, we found that TET3 also interacts with NSD3 and two other H3K36 methyltransferases and is able to induce H3K36 trimethylation. We propose a mechanism for transcriptional activation in neurons that involves REST-guided targeting of TET3 to the DNA for directed 5hmC generation and NSD3-mediated H3K36 trimethylation.

INTRODUCTION

Epigenetic mechanisms are critically involved in neuronal differentiation and synaptic network formation. 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), a recently identified epigenetic DNA modification, is present at high levels in the brain (Münzel et al., 2010) and accumulates during neuronal differentiation (Hahn et al., 2013). 5hmC is generated by ten-eleven translocation (TET) hydroxylases (TET1-3) from 5-methylcytosine (5mC) (Kriacounis and Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009). Accumulation of 5hmC in neuronal genes was shown to correlate positively with gene expression (Colquitt et al., 2013; Hahn et al., 2013; Mellén et al., 2012; Song et al., 2011; Szulwach et al.,

2011), suggesting that 5hmC plays a key role in neuronal differentiation (Santiago et al., 2014). How TET hydroxylase activity is controlled and directed to neuronal genes is not known. The TET1 isoform contains an amino-terminal CXXC domain that is thought to be important for binding to DNA (Xu et al., 2011). Tet2 lacks such a CXXC domain, but was shown to functionally interact with the CXXC domain containing proteins CXXC4 and CXXC5 (Ko et al., 2013; Williams et al., 2011).

TET3, the major TET isoform in neurons (Colquitt et al., 2013; Hahn et al., 2013), exists in various isoforms generated by alternative splicing (Liu et al., 2013), two isoforms containing a CXXC domain and one shorter isoform lacking such a domain. In particular, the TET3 lacking a CXXC domain (neuronal TET3) was shown to be enriched in neuronal tissue (Liu et al., 2013). It is not known how neuronal TET3 is targeted to the DNA. It was suggested that transcriptional regulators might bind directly to TET3, facilitating its specific targeting to genomic positions, and, hence, control 5hmC levels (Xu et al., 2012). Transcription-factor-dependent control of TET3 activity could potentially contribute to epigenetic regulation of gene expression in neurons. However, transcriptional regulators that functionally interact with TET3 have not been identified so far.

To directly address this issue, we investigated the function of TET3 and 5hmC during the formation of a complex neural network: the murine retina. We show that 5hmC levels increase during postnatal retinal network maturation. This gain of 5hmC results in an elevated expression of genes involved in important retinal and/or neuronal functions. To identify factors able to regulate TET3 activity and 5hmC formation in a gene-specific manner, we purified retinal nuclear proteins interacting with TET3. We found that the transcriptional regulator REST specifically interacts with the neuronal TET3 isoform and elevates its hydroxylase activity. Moreover, we show that TET3 overexpression induces the expression of REST target genes. We postulate that transcriptional activation of specific genes results from de novo chromatin remodeling that involves activity of histone 3 lysine 36 methyltransferases like NSD3.

RESULTS

5hmC Is Acquired during Postnatal Retinal Development

Development of neural networks is a complex process that involves the generation, positioning, and synaptic wiring of neurons. This developmental process is finalized with activity-dependent maturation of neurons and refinement of their network. In the mammalian retina, this terminal maturation process involves major morphological and functional changes, largely occurring within a week after eye opening (Hoon et al., 2014; Okawa et al., 2014). These morphological and functional refinements go along with significant changes in the gene expression pattern. To visualize these changes, we applied label-free quantification (LFQ) comparing the retinal protein levels in 2-week-old mice (eye opening) with 3-week-old mice (mature state; Figure 1A), and we found a significant upregulation of proteins involved in synaptic function and visual processing over time (Figures 1A and S1A; Table S1). The molecular mechanisms controlling the underlying transcriptional changes are only partially understood (Gregory-Evans et al., 2013; Xiang, 2013).

We hypothesized that epigenetic regulation at the level of DNA might be involved. First evidence comes from the finding that the levels of the epigenetic DNA modification 5hmC in brain neurons increase with age (Hahn et al., 2013; Münzel et al., 2010). To test for its involvement in terminal retinal maturation, we analyzed the levels of 5hmC during this period. We first used a 5hmC-specific antibody for immunolocalization studies on retinal cryosections and observed a strong increase of the 5hmC immunosignal in all nuclear layers of the retina between week 2 and week 3 (Figures 1B and 1C). At eye opening (week 2), we observed high levels of 5hmC in nuclei of cells within the inner nuclear layer (INL) and the ganglion cell layer (GCL). In contrast, photoreceptor nuclei located in the outer nuclear layer (ONL) were immunonegative (Figure 1B). Strikingly, only 1 week after eye opening (week 3), the levels of 5hmC increased dramatically in both the INL and the GCL. Moreover, rod and cone photoreceptors in the ONL were now positive for 5hmC (Figures 1C and 1D). Confirming the specificity of the anti-5hmC antibody, the immunosignal was quantitatively depleted by 2.5 μ M 5hmC-containing DNA oligonucleotides (Figure 1C, inset). At the sub-nuclear level, most of the 5hmC signal was found to localize in euchromatic regions in both conventional and inverted nuclei (Figures 1E and 1F). In contrast, we found 5mC to be concentrated in pericentromeric heterochromatin (Figures 1E and 1F), suggesting that while 5mC is present in transcriptionally silenced regions, 5hmC is associated with transcriptional activity.

To quantify the levels of 5hmC along with all other cytosine modifications in mouse genomic DNA, we combined ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) (Schiesser et al., 2013; Table S7). The levels of 5hmC increased significantly (Figure 1G and S1B) ($p < 0.005$, Student's *t* test), whereas the levels of the further oxidized derivative 5-formylcytosine (5fC) dropped significantly during the same time frame (Figures 1I and S1C), suggesting distinct roles for 5hmC and 5fC in neurons. Interestingly, the levels of 5mC remained stable during this developmental window (Figures 1H and S1D).

Thus, retinal cells specifically accumulate genomic 5hmC levels during terminal retinal maturation. Importantly, retinal cells

at this developmental stage do not divide; thus, this effect cannot result from increased DNA replication.

To investigate the dynamics of 5hmC and 5mC formation in non-dividing cells, we performed an isotope-tracing experiment by culturing retinal explants from 11-day-old mice for 12 days in the presence of the labeled methyl group donor [$^{13}\text{CD}_3$]-methionine, which provides labeled 5mC (5-[$^{13}\text{CD}_3$]-mC) and 5hmC (5-[$^{13}\text{CD}_2$]-hmC) that can be quantified using UHPLC-MS/MS (Table S8). Confirming the presence of de novo methylation in terminally differentiated retinal cells, we detected 5-[$^{13}\text{CD}_3$]-mC at linearly increasing levels (slope: 0.531, $R^2 = 0.999$) reaching a value of 3.9% of total 5mC after 9 days of [$^{13}\text{CD}_3$]-methionine feeding (Figure 1J). We further detected [$^{13}\text{CD}_2$]-labeled 5hmC (Figure 1K). However, the level of 5-[$^{13}\text{CD}_2$]-hmC was low with only up to 1.6% after 9 days (slope: 0.208, $R^2 = 0.997$). Moreover, the majority of de novo 5hmC was generated from pre-existing and hence unlabeled 5mC (Figure S1E).

5hmC Accumulates in Neuronal Genes and Leads to Increased Gene Expression

To assess the genomic distribution of 5hmC during retinal maturation, we performed antibody-based 5hmC DNA immunoprecipitation (hMeDIP) from 2- and 3-week-old retina followed by next-generation sequencing (NGS). In agreement with the immunohistochemical and UHPLC-MS/MS quantification data, we identified 5,921 intragenic regions that gained 5hmC signal and approximately 20 times less with lost 5hmC signal (Figures 2A and S2A; Table S9). Gene ontology (GO) analysis revealed that genes involved in the morphology of nervous system, CNS development, differentiation of neurons, neuritogenesis, or guidance of axons are significantly enriched within the group of genes that gained 5hmC after eye opening (from week 2 to week 3) (Figure 2B). The genes enriched in the hMeDIP analysis were positively correlated to those enriched in the group of proteins with elevated expression in the mature retina ($p = 6.2 \times 10^{-11}$, Fischer's exact test; Figures 1A and S2B; Table S1). Moreover, 5hmC marks were particularly enriched in gene bodies (Figure 2C), suggesting a regulatory function of 5hmC in gene expression. To investigate if gain of 5hmC is associated with active transcription, we correlated the hMeDIP data with the LFQ protein expression data and found that gain of 5hmC levels from week 2 to week 3 resulted in significantly increased protein expression of the corresponding genes (Figure 2D).

Neuronal TET3 Interacts with Transcriptional Regulators and Histone Writers

5hmC is generated from 5mC by TET hydroxylases. To study if the elevated 5hmC levels in the mature retina result from increased TET-mediated oxidation, we analyzed the expression profile of the three TET enzymes during postnatal development of the mouse retina. We first found that TET3 is the dominant isoform in the retina and its levels increase at eye opening (Figure 3A; Table S10). Importantly, the expression levels at eye opening (postnatal day 13, p13) and at the mature stage (p20) were comparable, ruling out that increased Tet expression causes the increased 5hmC levels (Figure 3A).

TET3 exists in three isoforms that differ in their N-terminal sequence: two isoforms with a CXXC DNA-binding domain and

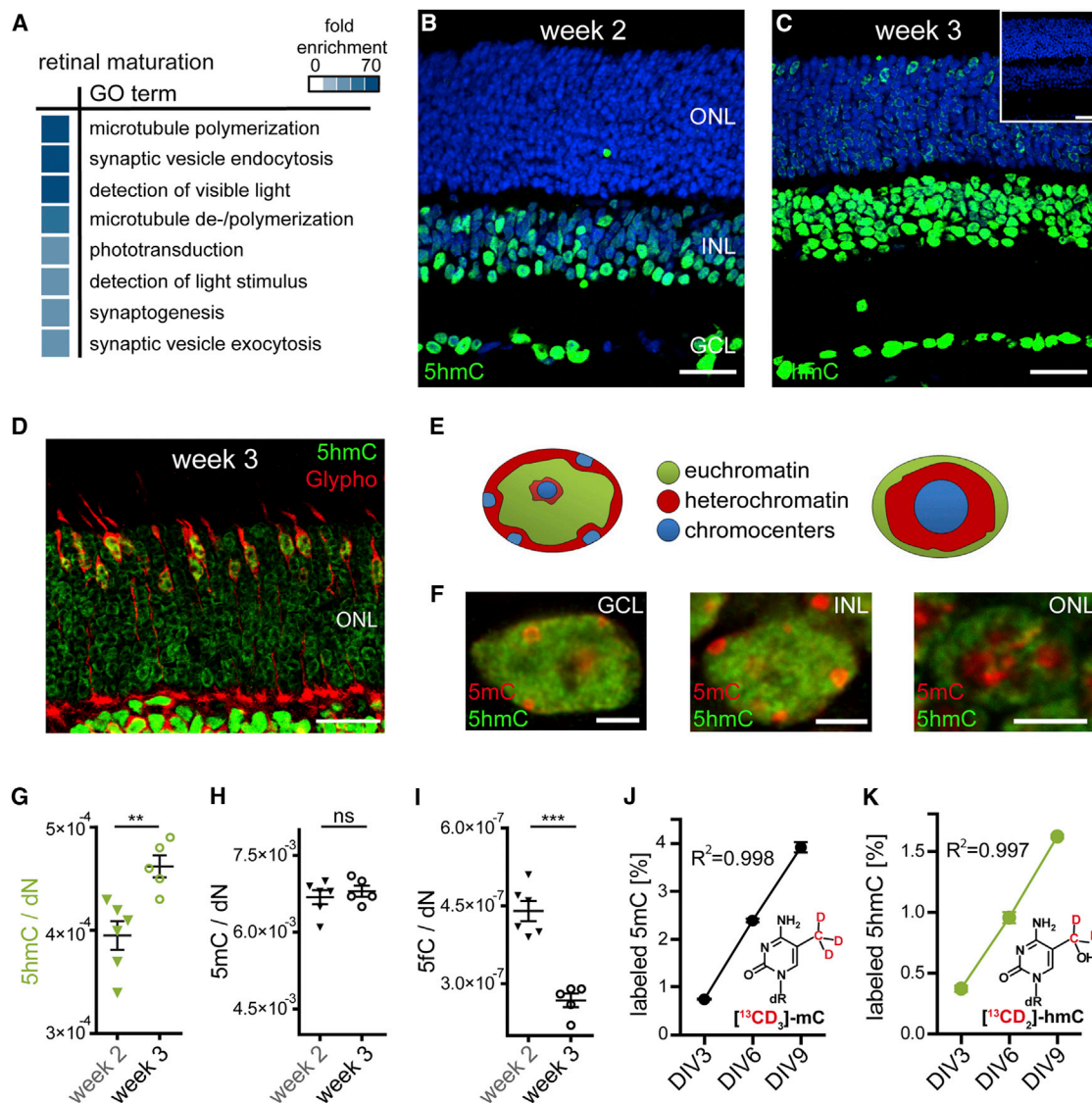


Figure 1. Transcriptional and Epigenetic Changes during Retinal Maturation

(A) GO analysis of upregulated proteins during retinal maturation (from eye opening at week 2 to terminal maturation of the retina at week 3) identified by LFQ is shown.

(B and C) Confocal scans from mouse retinal slices at week 2 (B) and week 3 (C) immunolabeled for 5hmC (green). There is a marked increase in 5hmC signal in nuclei of all retinal layers from week 2 to week 3, in particular in photoreceptors (ONL). The inset in (C) is from a depletion experiment proving the specificity of the anti-5hmC antibody.

(D) Magnification of ONL stained for 5hmC (green) and glycogen phosphorylase (Glypho) (red) is shown.

(E) Schematic view of conventional and inverted nuclei depicts heterochromatin and euchromatin regions.

(F) High-magnification images of conventional nuclei within the GCL or the INL and a rod nucleus with inverted nuclear architecture (Solovei et al., 2009) co-immunolabeled with 5hmC (green) and 5mC (red). In all cases, 5hmC is mainly found in euchromatin whereas 5mC is localized in heterochromatic regions.

(G–I) Scatter plots of UHPLC-MS/MS quantification of global (G) 5hmC, (H) 5mC, and (I) 5fC in the mouse retina at weeks 2 and 3 reveal an age-dependent increase in 5hmC levels, stable 5mC levels, and decreasing 5fC levels.

(J and K) Isotope tracing combined with UHPLC-MS/MS in mouse retinal explant cultures. Retinal explant cultures were fed with [methyl-¹³CD₃]-L-methionine and harvested for UHPLC-MS/MS quantification of labeled 5mC (J) and 5hmC (K) after 3, 6, and 9 days in vitro (DIV). Summary data are mean \pm SEM in (G–I) and mean \pm SD in (J and K). **p < 0.01, ***p < 0.001 (Student's t test). The cell nuclei in (A and B) were stained with Hoechst 3442 nuclear dye (blue). Scale bar, 25 μ m in (B–D) and 3 μ m in (F). See also Figure S1 and Tables S7 and S8.

a short isoform enriched in neuronal cells lacking the CXXC domain (Liu et al., 2013). Using isoform-specific primer sets, we found that the short variant lacking the CXXC domain is the

major TET3 isoform in the retina (Figure 3B). Other than the isoforms with the CXXC domain, this neuronal TET3 variant has no DNA-binding affinity (Xu et al., 2012). We hypothesized that

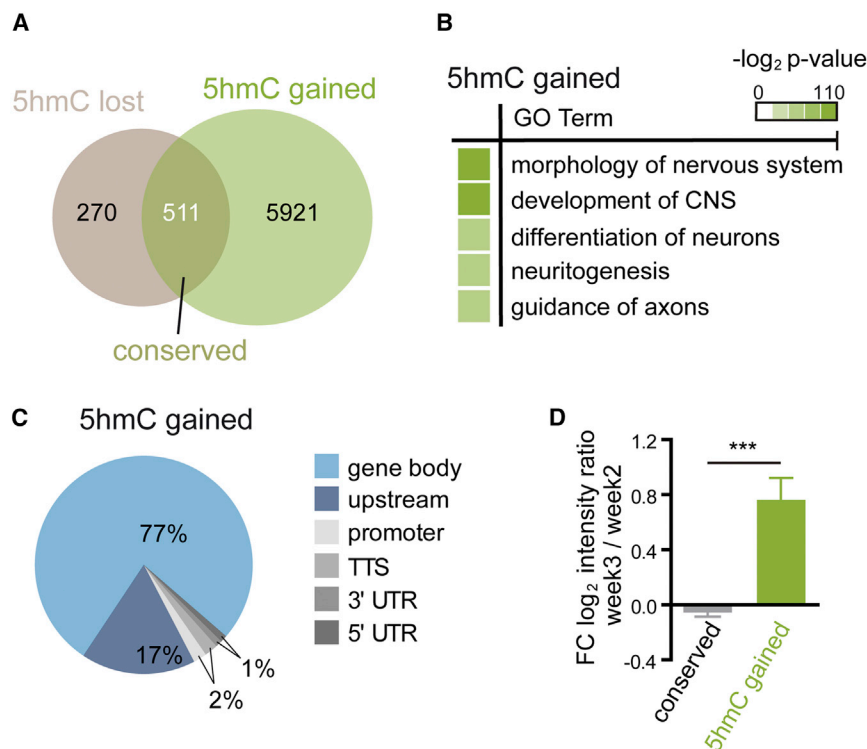


Figure 2. Genomic Localization of 5hmC in the Mouse Retina and Its Effect on Gene Expression

(A) Venn diagram shows 5hmC dynamics during retinal maturation (postnatal week 3/postnatal week 2). (B) GO analysis of genes that gained 5hmC during retinal maturation is shown. (C) Pie chart shows intragenic distribution of 5hmC regions in mature retina. (D) LFQ of proteins encoded by genes with conserved (gray) or gained (green) 5hmC levels during retinal maturation. Summary data are mean \pm SEM. ***p < 0.001 (Student's t test). TSS, transcription starting site; TTS, transcription termination site. See also Figure S2 and Table S9.

unknown DNA-binding (transcription) factors could bind and target neuronal TET3 to pre-existing 5mC for subsequent oxidation to 5hmC (Figure 3C). To identify nuclear proteins that have the potential to specifically bind to neuronal TET3 in mouse retina, we combined affinity purification with mass spectrometry (MS). To this end, we transduced mouse retinal explant cultures with lentiviral vectors expressing an eGFP-fusion protein of the neuronal TET3 splice variant. Control cultures were transduced with lentiviral vectors expressing eGFP only. After onset of expression, nuclear protein complexes were extracted, affinity-purified, and subsequently labeled with TMT 2-plex reagents in forward and reverse label-swap experiments for comparative quantification using LC-MS (see the Experimental Procedures). These experiments allowed us to identify 52 proteins that were significantly enriched for binding to TET3 (>1.5-fold enrichment) in forward and reverse labeling experiments (Figure 3D, bottom right quadrant). Notably, nine of those proteins, such as REST, SUZ12, and CEP290, could be classified as regulators of transcription (Figure 3D; Table S2). Another six proteins are histone variants involved in chromatin modification, i.e., H3F3A and H2AFJ (Figure 3D; Table S2).

TET3 is endogenously expressed in the mouse retina (Figure 3A). Thus, TET3-eGFP is expected to compete for binding partners with endogenous TET3. To identify proteins that bind to endogenous TET3, we repeated the affinity purification experiment using a TET3-specific antibody. Endogenous TET3 was highly enriched by the antibody highlighting its specificity (Figure 3E). Moreover, we identified five transcriptional regulators (ASXL1, CTCF, MORF4L1, REST, and VAX1), three H3K36 methyltransferases (NSD2, NSD3, and SETD2), and histone 3 (H3F3A)

as interactors with significant enrichment for binding to endogenous TET3 (>1.5-fold) (Figure 3E; Table S3). Interestingly, the TET3-interacting protein with the highest enrichment score was the transcriptional repressor REST (Figure 3E), which was also significantly enriched in the TET3-eGFP affinity purification experiment (Figure 3D). To verify the TET3-REST interaction, we performed a reverse experiment using a REST-specific antibody that efficiently immunoprecipitates endogenous REST from mouse retina (Figure 3F; Table S4). Importantly, in this experiment, the REST antibody affinity-purified TET3 very efficiently with the overall third-highest enrichment score, but failed to immunoprecipitate TET1 and TET2 (Figure 3F). Moreover, none of the identified TET3 peptides was specific for the long CXXC-containing isoforms, suggesting that REST interacts specifically with the neuronal TET3 isoform. Taken together, these experiments identify REST as a major specific interacting protein of neuronal TET3.

REST Recruits Neuronal TET3 to Mediate 5hmC Formation and Transcriptional Activation

To determine the functional effects of REST on TET3 hydroxylase activity, we overexpressed TET3-eGFP alone and together with REST in HEK293T cells and subsequently quantified the 5hmC levels (Figure 4A). Non-transfected HEK293T cells have very low endogenous 5hmC levels, and overexpression of TET3-eGFP alone resulted in increased 5hmC levels (Figure 4A). Importantly, however, after co-expression with REST, TET3-eGFP generated significantly higher levels of 5hmC (Figure 4A). Conversely, after small interfering RNA (siRNA)-mediated knock-down of endogenous REST, overexpression of TET3-eGFP led to a significantly weaker elevation of 5hmC levels compared to control siRNA treatment (Figure 4B). Thus, REST is both necessary and sufficient to elevate TET3 hydroxylase activity.

REST is a transcriptional repressor that binds to specific RE-1 binding sites present in regulatory regions of its target genes (Kraemer et al., 1992). Binding of REST results in transcriptional repression of the corresponding genes (Chong et al., 1995; Schoenherr

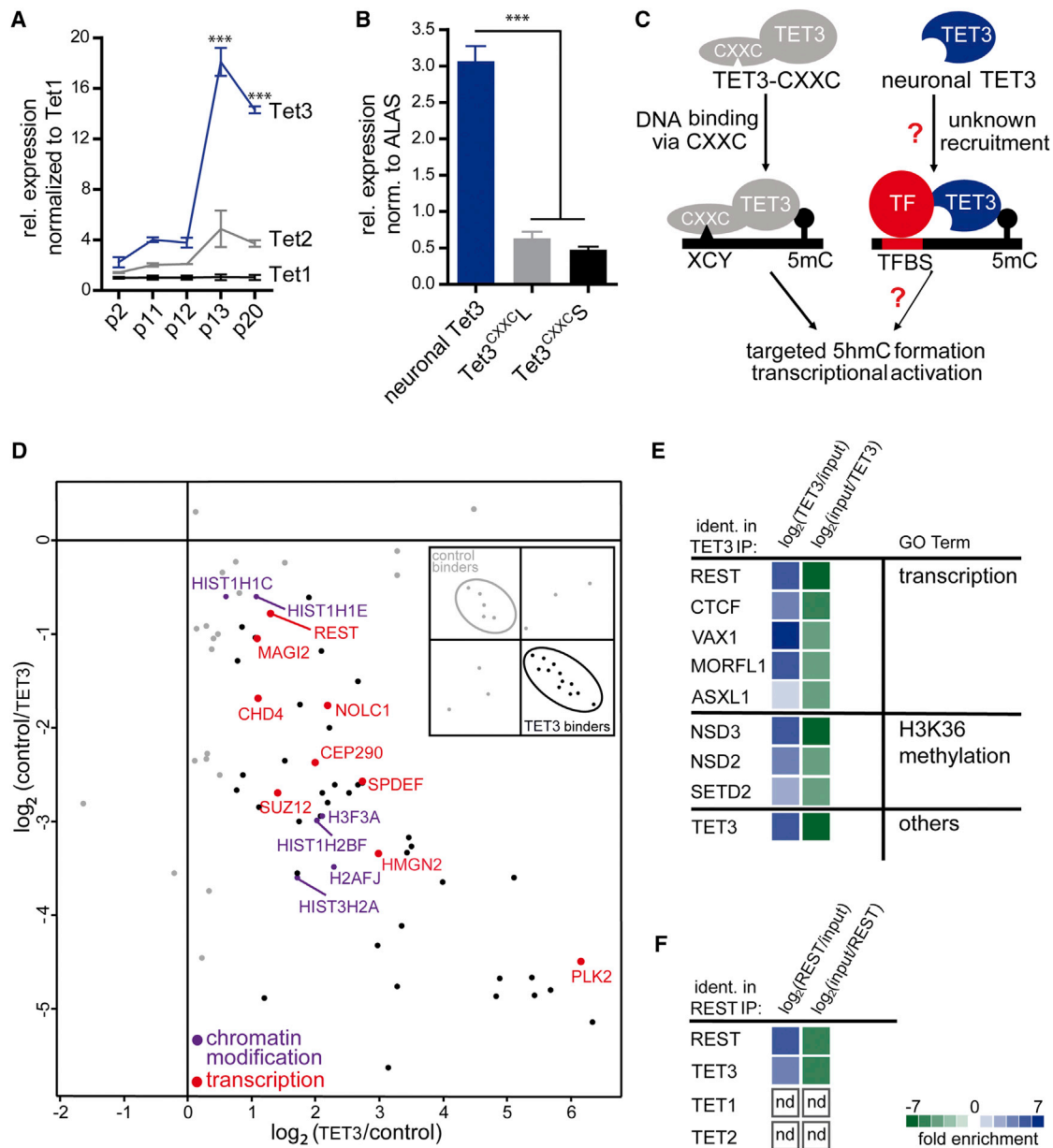


Figure 3. Tet Expression Levels and Identification of TET3-Interacting Proteins in Retina

(A) qRT-PCR analysis of Tet1, Tet2, and Tet3 gene expression in mouse retina at postnatal day (p) 2, 11, 12, 13, and 20 normalized to corresponding Tet1 levels. Tet3 is expressed significantly higher than Tet1 and Tet2 at p13 and p20.

(B) qRT-PCR analysis of Tet3 isoforms. Tet3 lacking a CXXC DNA-binding domain (neuronal Tet3) is the main isoform in retina.

(C) Cartoon illustrating putative DNA-binding mechanisms of TET3 isoforms lacking (neuronal TET3) or containing a CXXC domain. We hypothesized that neuronal TET3 is recruited to the DNA by transcription factors for context-specific hydroxymethylation and induction of gene expression.

(D) Scatter plot is shown of TET3 interactors identified using lentiviral TET3-eGFP overexpression (OE) in retinal explant cultures followed by GFP-trap and LC-MS/MS.

(E) Heatmap of endogenous TET3 interaction partners identified by immunoprecipitation and LC-MS/MS is shown.

(F) Heatmap of endogenous REST immunoprecipitation LC-MS/MS experiment confirms the interaction with endogenous TET3 (nd, not detected). Summary data are mean \pm SEM in (A and B). *** $p < 0.001$ (one-way ANOVA). See also Table S10.

and Anderson, 1995). We therefore asked whether TET3 might affect gene expression of REST target genes. To address this question, we overexpressed TET3-eGFP in HEK293T cells that endogenously contained REST (Dietrich et al., 2012), and we

determined the global protein levels using LFQ (Figures 4C–4E). Overexpression of TET3-eGFP resulted in significant upregulation of 40 proteins, and 26 of those were previously non-expressed (proteins with infinite log2 ratios in Figure 4E).

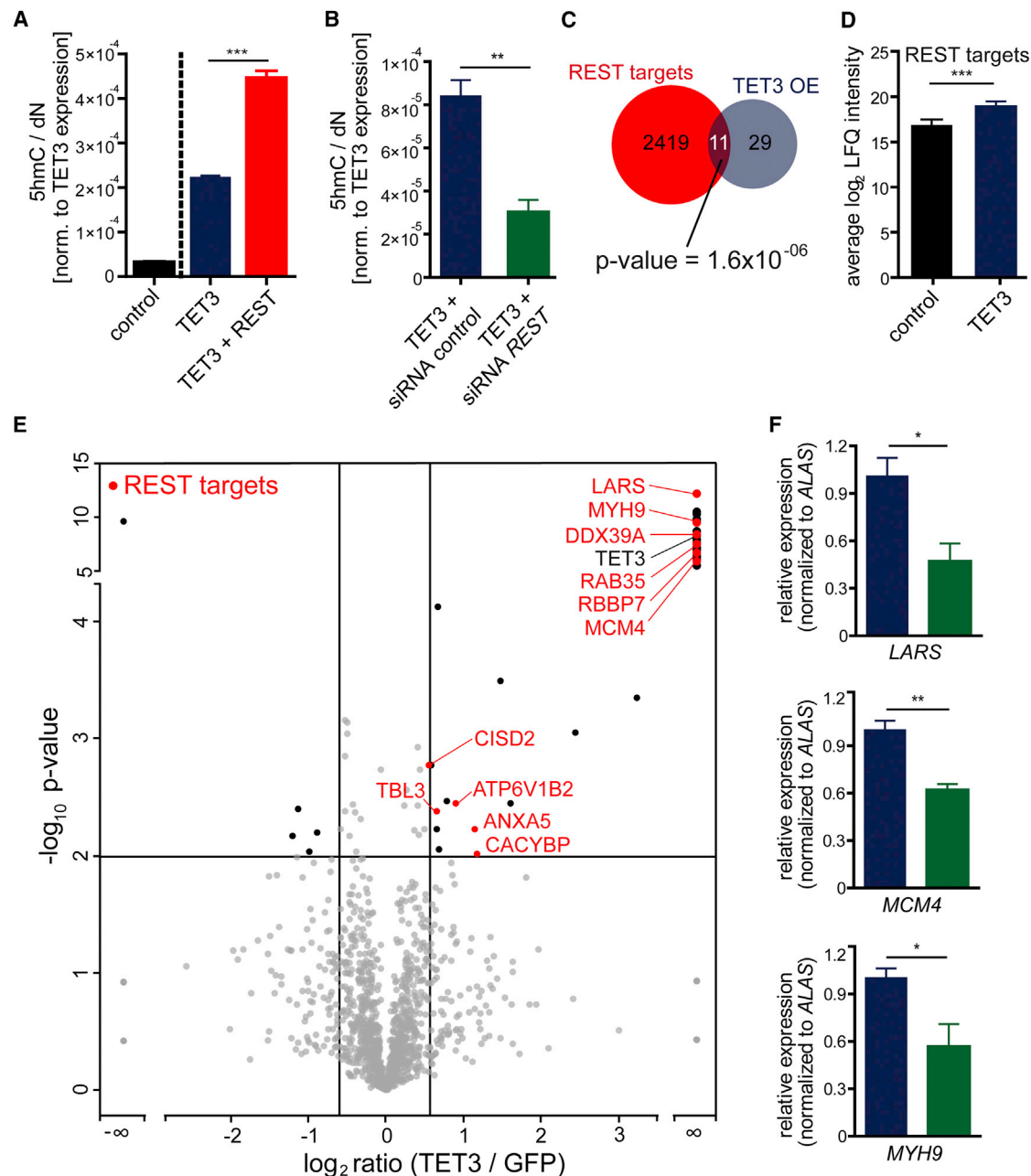


Figure 4. Functional Analysis of the Interaction of Transcriptional Repressor REST with Neuronal TET3

(A) UHPLC-MS/MS quantification of global 5hmC levels after OE of TET3-eGFP or REST and TET3-eGFP is shown.

(B) UHPLC-MS/MS quantification of global 5hmC levels after OE of TET3-eGFP in the presence of siRNA directed against human REST or a scrambled siRNA control (ctrl) is shown.

(C) Identification of global REST target gene expression using LFQ after eGFP (control) or TET3-eGFP OE in HEK293T cells. REST target genes are expressed significantly higher after TET3 OE.

(D) Venn diagram shows the significant overlap (Fisher's exact test; p value = 1.6×10^{-6}) of proteins enriched after TET3 OE and REST target genes in HEK293T cells.

(E) Volcano plot of protein expression ratios between TET3-eGFP and eGFP OE experiments in HEK293T cells as a function of statistical significance (Student's t test p value ≤ 0.01). Proteins with no statistically significant difference in expression between subsets are gray. Proteins with no detectable signal in one of the subsets were assigned a ratio of infinity. REST target genes are highlighted in red.

(F) Quantification of gene expression of three TET3-induced REST target genes in HEK293T cells using qRT-PCR after OE of TET3-eGFP in the presence of siRNA directed against human REST (green) or a scrambled siRNA control (ctrl, blue). Summary data in (A–C and F) are mean \pm SEM. *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001 (Student's t test). See also Table S11.

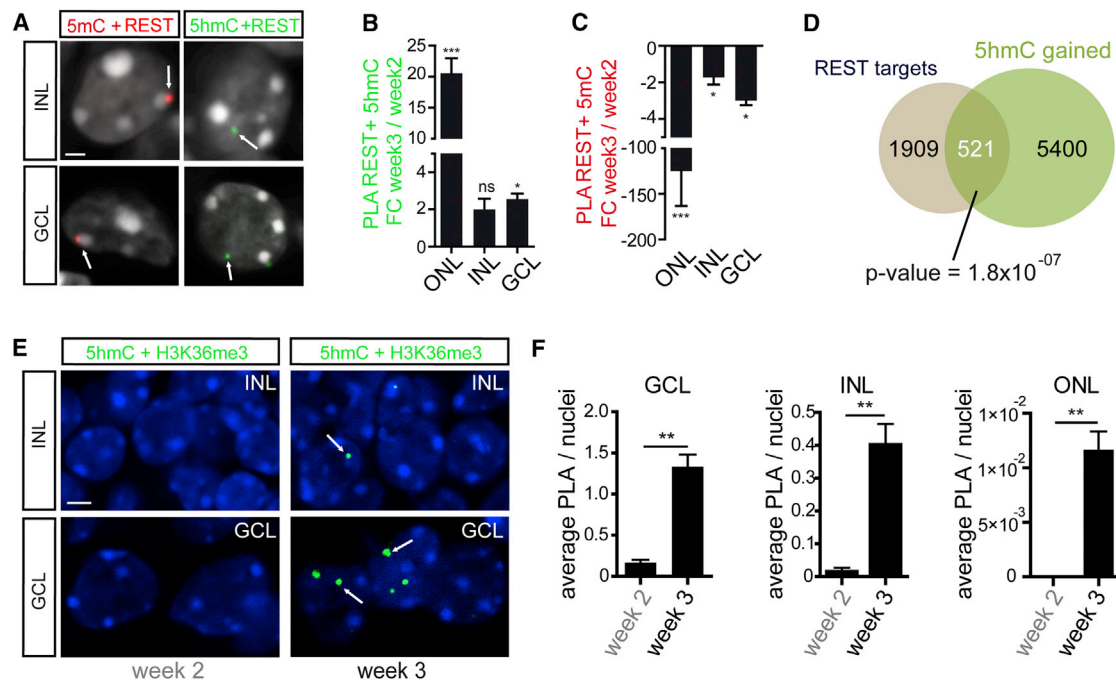


Figure 5. Accumulation of 5hmC in REST Target Genes Is Associated with Chromatin Remodeling

(A) PLA signal for 5mC and REST (red) is localized in heterochromatin. In contrast, the PLA signal for 5hmC and REST is localized in euchromatin (green).

(B and C) Quantification data of the 5hmC/REST (B) and 5mC/REST (C) PLA experiments in (A) are shown.

(D) Venn diagram shows the significant overlap (Fisher's exact test; p value = 1.8×10^{-07}) of REST target genes and 5hmC-gained genes during retinal maturation.

(E) PLA signal for 5hmC and H3K36me3 (green) in nuclei of the INL (top) and the GCL (bottom) at week 2 (left) and week 3 (right).

(F) Quantification data of the 5hmC/H3K36me3 PLA experiments in (E) are shown. Summary data in (B, C, and F) are mean \pm SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (Student's t test). Scale bar, 1 μ m in (A) and 5 μ m in (E).

Interestingly, 308 of the identified proteins were known REST targets (Lu et al., 2014), and the average log₂ LFQ intensity of those REST targets was significantly higher after TET3 overexpression compared to the eGFP control (Figure 4C). Importantly, 11 of the 40 TET3-induced proteins ($p = 1.6 \times 10^{-6}$, Fischer's exact test) were REST targets (Figure 4D; Table S5) and six of those (DDX39A, LARS, MCM4, MYH9, RAB35, and RBBP7) were previously non-expressed proteins (Figure 4E; Table S5).

To test if this TET3-mediated induction of REST target genes in HEK293T cells depends on REST, we overexpressed TET3-eGFP in the presence of REST-specific siRNA or scrambled control siRNA and measured the transcript levels of *LARS*, *MCM4*, and *MYH9* (Table S11). As shown in Figure 4E, all three REST target genes were exclusively expressed in the presence of TET3. Interestingly, in all three cases, the positive effect of TET3 on gene expression was significantly lower after knock-down of endogenous REST (Figure 4F), confirming that TET3 requires the presence of REST to de-repress REST target genes.

Accumulation of 5hmC in REST Target Genes Is Associated with Chromatin Remodeling

These results indicate that REST directs TET3 to repressed target genes and subsequent hydroxylation of pre-existing 5mC, then leads to de-repression and transcriptional activation of the genes. Repressed genes are usually found in hetero-

chromatin, whereas actively transcribed genes are located in euchromatin. As shown in Figure 1F, 5mC is enriched in heterochromatic structures and 5hmC in euchromatin. To test for the co-localization of REST with 5mC and 5hmC in nuclei of retinal neurons, we applied an in situ proximity ligation assay (PLA) combining REST-specific with 5mC- or 5hmC-specific antibodies. PLA gives only a positive signal when 5mC or 5hmC and REST are in close proximity (<40 nm) (Söderberg et al., 2006). We observed a positive PLA signal for both combinations, REST/5mC as well as REST/5hmC (Figure 5A). Importantly, the PLA signal for REST/5mC was localized in heterochromatin (Figure 5A, top), whereas the REST/5hmC signal was observed in euchromatin (Figure 5A, bottom). Thus REST-binding sites show distinct subnuclear localization depending on the oxidation status of adjacent genomic cytosines. Interestingly, the levels of PLA signal for REST/5mC and REST/5hmC varied significantly between week 2 and week 3 (Figures 5B and 5C). In particular, the REST/5hmC PLA signal correlated positively with the 5hmC levels increasing from week 2 to week 3 (Figure 5B). In contrast, the PLA signal for REST/5mC showed an inverse behavior, decreasing during the same period of time (Figure 5C). Together, these results suggest a functional correlation between REST-binding sites and proximal epigenetic DNA marks that might affect chromatin state and gene expression.

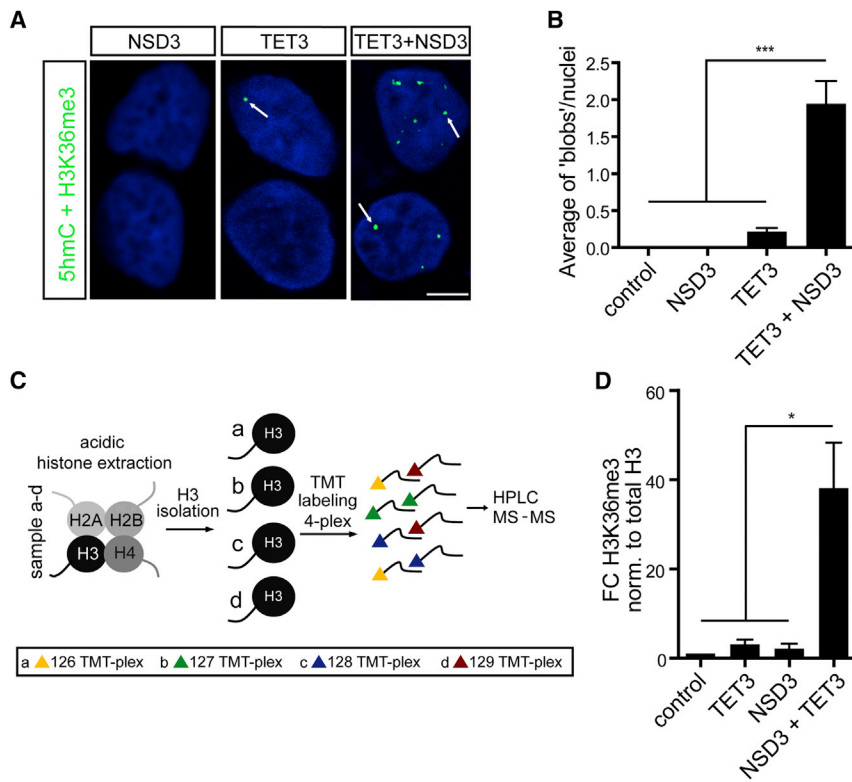


Figure 6. Effect of TET3-Mediated Hydroxymethylation on Chromatin Structure

(A) PLA signal for 5hmC and H3K36me3 in HEK293T cells overexpressing NSD3 (left), TET3-eGFP (middle) and TET3 + NSD3 (right). (B) Quantification data of the 5hmC/H3K36me3 PLA experiments in (A) are shown. (C) Scheme of TMT⁴-plex isobaric labeling and LC-MS quantification of H3 modifications is shown. (D) Isobaric labeling LC-MS quantification of H3K36me3 in HEK293T cells overexpressing TET3, NSD3, or TET3 and NSD3 compared to non-transfected cells. Summary data are mean \pm SEM in (B and D). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (one-way ANOVA). Scale bar, 5 μ m in (A).

tone H3 at lysine 36 (H3K36), which is an epigenetic mark commonly associated with transcription of active chromatin (Bernstein et al., 2005; Heintzman et al., 2007; Kouzarides, 2007).

TET3 Regulates NSD3 H3K36 Trimethylation Activity

To test if the TET3/NSD3 interaction is functionally relevant, we performed a PLA experiment with HEK293T cells transfected with TET3 and/or NSD3,

focusing on the co-localization of the products of the two enzymes, 5hmC and H3K36me3, respectively. NSD3 overexpression did not result in any detectable PLA signal (Figures 6A and 6B), which is in line with the very low levels of 5hmC in HEK293T cells (see Figure 4A). TET3-overexpressing cells showed only a few PLA signals, indicating that 5hmC elevation alone does not automatically result in 5hmC/H3K36me3 co-localization (Figures 6A and 6B). However, when both TET3 and NSD3 were overexpressed, we observed a synergism that resulted in a significant increase of the 5hmC/H3K36me3 PLA signal (Figures 6A and 6B). We next isolated and enriched histone 3 and quantified the extent of K36 trimethylation of histone 3 using isobaric labeling and MS (Figure 6C). This experiment showed a 40-fold increase in the levels of H3K36me3 in the HEK293T cells co-overexpressing TET3 and NSD3 compared to non-transfected cells (Figure 6D). Overexpression of TET3 or NSD3 alone provided only about a 2-fold increase of the H3K36me3 activation mark (Figure 6D). Thus, TET3 has a synergistic effect on the lysine methyltransferase activity of NSD3.

TET3 Overexpression in Retina Leads to Neuronal Gene Activation and H3K36me3

To analyze if TET3 overexpression has an effect on global gene expression in the retina, we transduced retinal explant cultures with lentiviral vectors expressing TET3-eGFP. Compared to retinal explant cultures overexpressing eGFP only, we identified 981 proteins that were upregulated after TET3-eGFP overexpression (Table S6). The TET3-eGFP overexpression strongly affects gene expression in the retina, resulting in the upregulation of proteins involved in several neurological functions (Figure 7A).

To test if REST has an effect on the genomic 5hmC content in the retina, we re-analyzed our 5hmC mapping data (see Figures 2A–2C) by searching for known REST target genes (Lu et al., 2014) within the subset of genes that gained 5hmC marks from week 2 to week 3 (Figure 5D). In support of a positive effect of REST on genomic 5hmC levels in the retina, we found a significant enrichment of REST target genes within the group of genes that gained 5hmC during retinal maturation ($p = 1.8 \times 10^{-7}$, Fischer's exact test) (Figure 5D).

Transcriptional activation of previously silenced genes requires chromatin remodeling, e.g., a switch from a heterochromatic to a euchromatic state (Voss and Hager, 2014). It was suggested that REST-mediated chromatin remodeling involves changes of the activating histone mark lysine 36 trimethylation of the nucleosomal histone H3 (H3K36me3) (Zheng et al., 2009). To test for this chromatin remodeling during retinal maturation, we analyzed the co-localization of 5hmC with H3K36me3 using specific antibodies in combination with PLA. As shown in Figures 5E and 5F, we observed a clear increase of the PLA signal for 5hmC/H3K36me3 co-localization in nuclei of 3-week-old retina, whereas at 2 weeks only a few or no PLA signals were observed. This increase in 5hmC/H3K36me3 PLA signal was observed in nuclei of all three major retinal layers (Figure 5F). Thus, from week 2 to week 3, the chromatin structure in retinal nuclei changed in a way that led to co-localization of 5hmC with the active chromatin mark H3K36me3.

Notably, three of the identified TET3-interacting proteins were the post-SET domain containing histone-lysine N-methyltransferases NSD3, NSD2, and SETD2 (Figure 3E). These histone writers are involved in the (tri-) methylation of nucleosomal his-

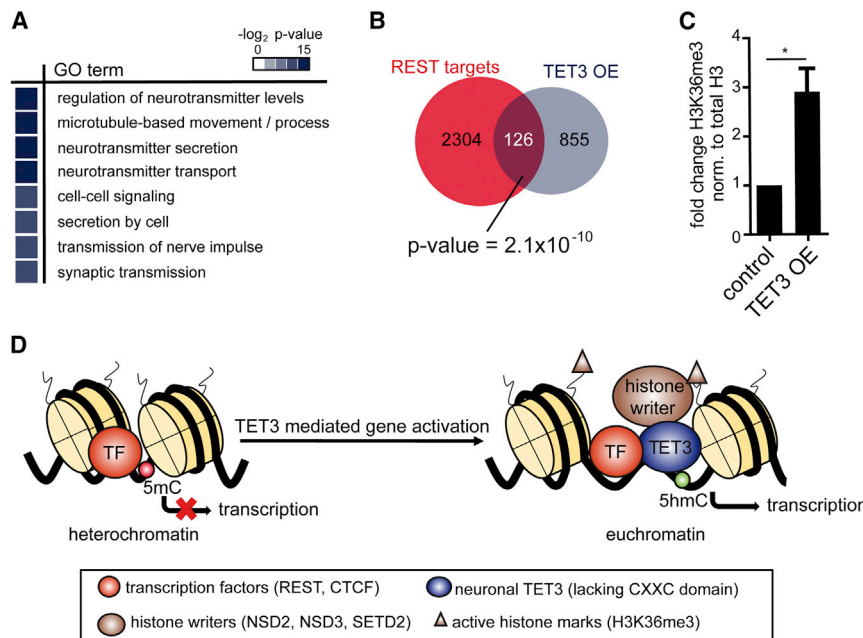


Figure 7. TET3 Overexpression Leads to Activation of Neuronal Genes and H3K36 Trimethylation during Retinal Maturation

(A) GO analysis reveals strong enrichment of neuronal proteins within the subset of proteins induced after TET3 OE in mouse retinal explants. (B) Venn diagram shows the significant overlap (Fisher's exact test; p value = 2.1×10^{-10}) of proteins enriched after TET3 OE and REST target genes.

(C) Isobaric labeling LC-MS quantification of H3K36me3 in mouse retina after TET3-eGFP or eGFP (control) OE. Summary data are mean \pm SEM. *p < 0.05 (Student's t test).

(D) Model for neuronal TET3-mediated transcriptional activation and chromatin remodeling. TET3 is recruited to the DNA by transcriptional regulators like REST for context-specific 5mC hydroxylation. Subsequently, TET3 mediates H3K36 trimethylation by recruitment of histone writers such as NSD3.

Correlation analysis again revealed that 126 known REST targets were significantly enriched in the subset of 981 TET3-upregulated proteins ($p = 2.1 \times 10^{-10}$, Fischer's exact test) (Figure 7B; Table S6).

To test whether TET3 also has a positive effect on lysine methyltransferase activity in the retina, we transduced retinal explant cultures with TET3-eGFP or eGFP using lentiviral vectors and determined the levels of H3K36me3 using isobaric labeling and MS. Overexpression of TET3-eGFP was able to elevate the levels of H3K36me3 by a factor of 3.8, suggesting that TET3-mediated hydroxylation of 5mC in retinal cells results in activation of NSD3 or similar enzymes to induce H3K36 trimethylation (Figure 7C). Our data indicate that this involves, at least in part, REST-assisted, TET3-mediated oxidation of genomic 5mC and subsequent NSD3-mediated chromatin remodeling.

DISCUSSION

Our comprehensive analysis of proteins interacting with the 5hmC-generating enzyme TET3 revealed a mechanism for specific epigenetic regulation of gene expression. We show that the transcription factor REST, a master regulator of genes involved in neuronal maturation processes (McGann et al., 2014), binds and recruits TET3 to the DNA for specific gene activation. In particular, we find that (1) REST regulates TET3 hydroxylase activity, (2) REST target genes accumulate 5hmC during retinal maturation, and (3) overexpression of TET3 activates REST target genes. In support of these findings, a recent study showed that deletion of REST in mouse embryonic stem cells (ESCs) led to significant loss of genome-wide 5hmC levels in regulatory regions (Feldmann et al., 2013). REST did not interact with TET1 or TET2. In addition, none of the TET3 peptides identified by MS after affinity purification of REST complexes from

mouse retinal lysates were specific for the TET3 isoforms with CXXC domain. Thus, REST-mediated recruitment of

TET3 seems to be specific for the neuronal TET3 isoform lacking a CXXC domain.

REST originally was described as a transcriptional repressor of neuronal genes in non-neuronal cells (Chong et al., 1995; Schoenherr and Anderson, 1995). In addition, REST was shown to be a key repressor in retinal ganglion cell commitment by preventing premature expression in retinal progenitor cells (Mao et al., 2011). It was hypothesized that, in neural progenitors, REST's repressive function is linked to gene regulatory networks related to neuronal differentiation (Mao et al., 2011). To act as a repressor, REST interacts with other proteins like mSin3a or COREST1 to form REST repressor complexes (Huang et al., 1999; McGann et al., 2014; Naruse et al., 1999). Importantly, none of the known REST-repressive complex proteins were identified in our REST-specific affinity purifications from mouse retinal lysates. There is now growing evidence suggesting that REST also plays a role in proper function of neuronal cells (Lu et al., 2014; Lunyak and Rosenfeld, 2005). For example, it was shown that REST functions as an activator of neuronal genes during neuronal maturation in the presence of a small double-stranded non-coding RNA corresponding to the NRSE/RE1 REST-binding sequence (Kuwabara et al., 2004).

Based on our 5hmC-mapping data, approximately 9% (521 of 5,921) of the genes that gained 5hmC during retinal maturation were known REST target genes. Thus, although REST contributes significantly ($p = 1.8 \times 10^{-7}$, Fischer's exact test) to context-dependent 5hmC generation, additional factors might exist for TET3 recruitment. In line with this, we identified several other transcriptional regulators interacting with TET3, such as ASXL1, CTCF, MORF4L1, SUZ12, and VAX1. It is tempting to speculate that these transcription regulators could influence TET3 hydroxylase activity in a similar way as REST. For instance, it was shown that the insulator CTCF interacts with TET enzymes

and that depletion of CTCF in mouse ESCs and adipocytes leads to significant loss of 5hmC in transcriptional enhancers (Dubois-Chevalier et al., 2014; Feldmann et al., 2013). However, CTCF seems not to discriminate among the TET isoforms, since it binds to TET1 and TET2 (Dubois-Chevalier et al., 2014) as well as to TET3 (present study).

Taken together, REST and most probably additional DNA-binding transcriptional regulators recruit TET3 to neuronal genes during retinal maturation to oxidize 5mC to 5hmC and activate their transcription. Transcriptional activation goes along with chromatin remodeling and translocation of genomic regions from 5mC-rich heterochromatin to 5hmC-rich euchromatin (Hahn et al., 2013; Mellén et al., 2012). Interestingly, our study reveals that TET3 interacts with several H3K36 methyltransferases. At a functional level TET3 stimulates the activity of NSD3 to generate the activating histone mark H3K36me3. Our data show that the transcriptional repressor REST can facilitate the recruitment of TET3 to 5mC-containing transcriptionally inactive genes (Figure 7D). This repressor-induced and context-specific recruitment is followed by TET3-mediated oxidation of 5mC to 5hmC. Subsequently, H3K36 methyltransferases induce chromatin remodeling to facilitate active transcription (Figure 7D).

Our findings favor a model that involves highly dynamic transcription-factor-dependent DNA hydroxymethylation that supports retinal network maturation by context-specific gene activation. Accordingly, our metabolic feeding experiments showed that the majority of nascent 5hmC marks were generated from pre-existing 5mC, supporting the idea of TET3-induced chromatin remodeling.

5hmC itself is known to recruit specific binding proteins (readers) (Mellén et al., 2012; Spruijt et al., 2013; Takai et al., 2014). We cannot exclude that such 5hmC readers might contribute to the observed TET3-mediated transcriptional activation during retinal maturation. Future study focusing on the identification of developmental-stage-specific 5hmC readers in the retina should help to elucidate their contribution.

In contrast to 5hmC, the levels of the further oxidized methylcytosine derivative 5fC in the retina were very low and decreased during neuronal maturation (see Figure S1C), suggesting that 5fC is a short-lived active DNA demethylation intermediate rather than an independent epigenetic mark in differentiating neuronal cells.

In conclusion, we provide evidence that TET3 and REST play a key role in the activation of neuronal gene transcription. Furthermore, we show that TET3-mediated gene activation involves H3K36 trimethylation-induced chromatin remodeling. This study provides a mechanistic link among REST-directed TET3-mediated 5hmC formation, subsequent chromatin remodeling by NSD3, and gene activation during neuronal maturation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

All mice used were on the C57BL/6 genetic background. All procedures concerning animals were performed with permission of the local authority (Regierung von Oberbayern). Day of birth was considered as postnatal day 1 (P1).

Lentiviral Constructs and Production

Mouse TET3 was PCR cloned from mouse retinal cDNA using the primers 5'-CTATCTAGAACCGCCATGGACTCAGGGCCAGTGAC-3' (forward) and 5'-TCACCGGTAAGATCCAGCGGCTGTAGGG-3' (reverse), and ligated into a lentiviral vector containing a cytomegalovirus (CMV) promoter (Mistrik et al., 2005), yielding LV-CMV-TET3ΔCXXC-eGFP. LV-CMV-eGFP expressing eGFP only was used for control experiments. Recombinant lentivirus as well as lentiviral particles were generated as described previously (Mistrik et al., 2005).

In Vitro Retinal Explant Cultures

Retinas from wild-type animals were used to generate retinal explants. Animals were killed and the eyes enucleated in DMEM Nutrient Mixture F12-HAM medium (Sigma) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. Afterward, the entire eyes were incubated in DMEM-F12 serum-free medium containing 0.12% proteinase K at 37°C for 15 min, to allow preparation of retinal cultures with RPE attached. Subsequently, proteinase K was inactivated using 10% FBS in DMEM Nutrient Mixture F12-HAM medium. The eyes were dissected aseptically in a Petri dish. The anterior segment, lens, vitreous, sclera, and choroids were carefully removed, and the retina was cut perpendicular to its edges, resulting in a cloverleaf-like shape. Subsequently, the retina was transferred to a Millicell culture dish filter insert (Millipore) with the retinal pigment epithelium layer facing the membrane. The insert was put into a six-well culture plate and incubated in DMEM-F12 Nutrient medium at 37°C.

Transduction of Retinal Explant Cultures

Retinal explant cultures from 11-day-old mice were used for transduction experiments using LV-CMV-TET3ΔCXXC-eGFP (neuronal TET3) or LV-CMV-eGFP (control). Twelve retinæ were used for each experiment. The LV particles were added to the scleral and vitreal part of retinal explants directly after preparation of the explant cultures. Every second day, the full volume of DMEM-F12, 1.2 ml per dish, was replaced with fresh medium. Retinal explants were harvested after 12 days in vitro for nuclear protein extraction.

Cell Culture and Transfection

HEK293T cells were grown at 37°C and 10% CO₂ in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. The cells were transfected with plasmids expressing mouse REST (Addgene plasmid 21310) and/or mouse TET3 (LV-CMV-TET3ΔCXXC-eGFP, see above) using calcium phosphate. Cells were incubated at 37°C and 10% CO₂ for 48 hr, with an additional medium exchange step after 24 hr from transfection. Upon harvesting, the cells were washed once with PBS after removing the medium, pelleted, and then lysed for subsequent genomic DNA extraction as described below.

For RNAi experiments, REST-specific siRNA duplexes or control siRNA duplexes (OriGene, SR304036) and plasmid-expressing mouse TET3 were transfected using siTRAN (OriGene) in Opti-MEM 1 reduced serum medium (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cells were incubated at 37°C and 10% CO₂ for 48 hr and subsequently harvested for genomic DNA isolation. Knockdown efficiency of gene expression was verified using qRT-PCR.

Tracing Experiments with [¹³C,³D₃]-Labeled L-methionine in Retinal Explants

De novo methylation-tracing experiments with [methyl-¹³C,³D₃]-methionine were performed in p11 retinal explant cultures (as described in the Supplemental Experimental Procedures) that were maintained in methionine-free DMEM containing 10% FBS and supplemented with 2 mM [methyl-¹³C,³D₃]-methionine for 9 days (after 3 days, media were renewed). Four retinal cultures were collected each 3 days after feeding and pooled for subsequent UHPLC-MS/MS quantification.

Data Interpretation of Interactors

From the identified proteins, only the proteins that were enriched in both the forward and the reverse experiments, with an enrichment factor of at least 1.5-fold over the control sample, are claimed as interactors. GO analysis

was performed using Ingenuity pathway analysis (IPA, Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com/>) or DAVID bioinformatics database (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).

Acid Extraction of Histones

To examine histone modifications of histone 3 (H3), we followed a protocol from Shechter et al. (2007). In brief, cells were lysed in 1 ml hypotonic buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, and 1 mM DTT. Samples were incubated for 30 min on rotator at 4°C. The intact nuclei were centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min at 4°C. Next, the nuclei were re-suspended in 400 μl 0.4 N H₂SO₄ and samples were incubated on rotator for 30 min. The nuclear debris was removed by centrifugation at 16,000 × *g* for 10 min. The supernatant was incubated for 30 min with 132 μl trichloroacetic acid (TCA) to precipitate histones. Histones were pelleted by 16,000 × *g* for 10 min and washed with acetone without disturbing the pellet to remove remaining acid from the solution. The pellets were eluted using ddH₂O.

Quantification of Histone Modifications

The visible protein band of histone H3 was cut out of a Coomassie-stained SDS-gel after destaining. The protein was in-gel alkylated and typically digested (Shevchenko et al., 2006). Trypsin activity was stopped using 1 mM PMSF and the peptides were labeled according to manufacturer's protocol with the TMT 2 (retina) or the TMT 4 (HEK293T cells).

Post-labeled samples of each experiment were pooled together and analyzed via LC-MS/MS. The relative reporter ion intensities of the trimethylated H3K36 peptide were normalized to the relative quantities of the whole protein. Finally, the fold change of the trimethylated peptides was calculated in relation to each control sample.

Bioinformatics

Sequence reads of 5hmC containing DNA fragments were mapped onto the reference mouse genome (NCBI Build UCSC mm9) using the Bowtie (v0.12.7) algorithm. Unique and monoclonal reads were used for further analysis. Refseq genes were downloaded from the UCSC mm9 annotation database (UCSC Genome Browser). GO analyses on differentially hydroxymethylated regions were performed using Ingenuity (IPA, Ingenuity Systems).

ACCESSION NUMBERS

The NCBI GEO accession number for the 5hmC profiling data reported in this paper is GSE65860. The ProteomeXchange accession number for the proteomics data reported in this paper is PXD001857.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, two figures, and 11 tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.020>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.M. and T.C. supervised the project. S.M., T.C., and A.P. designed experiments and interpreted data. A.P. conducted the analysis of gene expression, retinal explant culture, and LFQ proteomics. E.S., A.P., and N.M. performed protein pull-down studies. D.E. and S.K.L. performed peptide LC-MS quantification including sample preparation and analysis. A.F.K. conducted LFQ proteomics. M.W., J.S., and A.P. isolated genomic DNA. M.W., A.P., and J.S. performed sample preparation. M.W. and J.S. performed UHPLC-MS/MS quantification and isotope-tracing experiments of DNA bases. A.P., S.K., and S.M. performed and analyzed immunostainings and hMeDIP experiments. S.M. and E.S. generated expression plasmids and lentiviral vectors. A.P. and E.S. performed HEK293 cell culture experiments and acidic histone isolation. V.S. performed PLAs. A.P. and S.M. performed bioinformatics analysis. S.M. wrote the paper with input from other authors. M.B. and M.M. contributed to the experimental design, data interpretation, and manuscript editing.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) cluster of excellence (CIPSM, EXC114). A.F.K. is supported by a fellowship from the Peter und Traudl Engelhorn-Stiftung. We thank Gail Mandel for the gift of anti-REST antibodies; Tim M. Strom and Thomas Meitinger for NGS; Lukas Windhager, Ralf Zimmer, and Michael Bonin for help with bioinformatics analysis; and Fred Koch for help with cloning and qPCR.

Received: November 7, 2014

Revised: January 9, 2015

Accepted: March 7, 2015

Published: April 2, 2015

REFERENCES

- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., et al. (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120, 169–181.
- Chong, J.A., Tapia-Ramirez, J., Kim, S., Toledo-Aral, J.J., Zheng, Y., Boutros, M.C., Altschuler, Y.M., Frohman, M.A., Kraner, S.D., and Mandel, G. (1995). REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell* 80, 949–957.
- Colquitt, B.M., Allen, W.E., Barnea, G., and Lomvardas, S. (2013). Alteration of genic 5-hydroxymethylcytosine patterning in olfactory neurons correlates with changes in gene expression and cell identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 14682–14687.
- Dietrich, N., Lerdrup, M., Landt, E., Agrawal-Singh, S., Bak, M., Tommerup, N., Rappsilber, J., Södersten, E., and Hansen, K. (2012). REST-mediated recruitment of polycomb repressor complexes in mammalian cells. *PLoS Genet.* 8, e1002494.
- Dubois-Chevalier, J., Oger, F., Dehondt, H., Firmin, F.F., Gheeraert, C., Staels, B., Lefebvre, P., and Eeckhoutte, J. (2014). A dynamic CTCF chromatin binding landscape promotes DNA hydroxymethylation and transcriptional induction of adipocyte differentiation. *Nucleic Acids Res.* 42, 10943–10959.
- Feldmann, A., Ivanek, R., Murr, R., Gaidatzis, D., Burger, L., and Schübeler, D. (2013). Transcription factor occupancy can mediate active turnover of DNA methylation at regulatory regions. *PLoS Genet.* 9, e1003994.
- Gregory-Evans, C.Y., Wallace, V.A., and Gregory-Evans, K. (2013). Gene networks: dissecting pathways in retinal development and disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 33, 40–66.
- Hahn, M.A., Qiu, R., Wu, X., Li, A.X., Zhang, H., Wang, J., Jui, J., Jin, S.G., Jiang, Y., Pfeifer, G.P., and Lu, Q. (2013). Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis. *Cell Rep.* 3, 291–300.
- Heintzman, N.D., Stuart, R.K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C.W., Hawkins, R.D., Barrera, L.O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K.A., et al. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* 39, 311–318.
- Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L., and Wong, R.O. (2014). Functional architecture of the retina: development and disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 42, 44–84.
- Huang, Y., Myers, S.J., and Dingleline, R. (1999). Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes. *Nat. Neurosci.* 2, 867–872.
- Ko, M., An, J., Bandukwala, H.S., Chavez, L., Aijö, T., Pastor, W.A., Segal, M.F., Li, H., Koh, K.P., Lähdesmäki, H., et al. (2013). Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature* 497, 122–126.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.
- Kraner, S.D., Chong, J.A., Tsay, H.J., and Mandel, G. (1992). Silencing the type II sodium channel gene: a model for neural-specific gene regulation. *Neuron* 9, 37–44.

- Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324, 929–930.
- Kuwabara, T., Hsieh, J., Nakashima, K., Taira, K., and Gage, F.H. (2004). A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. *Cell* 116, 779–793.
- Liu, N., Wang, M., Deng, W., Schmidt, C.S., Qin, W., Leonhardt, H., and Spada, F. (2013). Intrinsic and extrinsic connections of Tet3 dioxygenase with CXXC zinc finger modules. *PLoS ONE* 8, e62755.
- Lu, T., Aron, L., Zullo, J., Pan, Y., Kim, H., Chen, Y., Yang, T.H., Kim, H.M., Drake, D., Liu, X.S., et al. (2014). REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature* 507, 448–454.
- Lunyak, V.V., and Rosenfeld, M.G. (2005). No rest for REST: REST/NRSF regulation of neurogenesis. *Cell* 121, 499–501.
- Mao, C.A., Tsai, W.W., Cho, J.H., Pan, P., Barton, M.C., and Klein, W.H. (2011). Neuronal transcriptional repressor REST suppresses an Atoh7-independent program for initiating retinal ganglion cell development. *Dev. Biol.* 349, 90–99.
- McGann, J.C., Oyer, J.A., Garg, S., Yao, H., Liu, J., Feng, X., Liao, L., Yates, J.R., 3rd, and Mandel, G. (2014). Polycarbonyl- and REST-associated histone deacetylases are independent pathways toward a mature neuronal phenotype. *eLife* 3, e04235.
- Mellén, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2012). MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell* 151, 1417–1430.
- Mistrić, P., Mader, R., Michalakakis, S., Weidinger, M., Pfeifer, A., and Biel, M. (2005). The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* 280, 27056–27061.
- Münzel, M., Globisch, D., Brückl, T., Wagner, M., Welzmler, V., Michalakakis, S., Müller, M., Biel, M., and Carell, T. (2010). Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49, 5375–5377.
- Naruse, Y., Aoki, T., Kojima, T., and Mori, N. (1999). Neural restrictive silencer factor recruits mSin3 and histone deacetylase complex to repress neuron-specific target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13691–13696.
- Okawa, H., Hoon, M., Yoshimatsu, T., Della Santina, L., and Wong, R.O. (2014). Illuminating the multifaceted roles of neurotransmission in shaping neuronal circuitry. *Neuron* 83, 1303–1318.
- Santiago, M., Antunes, C., Guedes, M., Sousa, N., and Marques, C.J. (2014). TET enzymes and DNA hydroxymethylation in neural development and function - how critical are they? *Genomics* 104, 334–340.
- Schiesser, S., Pfaffeneder, T., Sadeghian, K., Hackner, B., Steigenberger, B., Schröder, A.S., Steinbacher, J., Kashiwazaki, G., Höfner, G., Wanner, K.T., et al. (2013). Deamination, oxidation, and C-C bond cleavage reactivity of 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine, and 5-carboxycytosine. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 14593–14599.
- Schoenherr, C.J., and Anderson, D.J. (1995). The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science* 267, 1360–1363.
- Shechter, D., Dormann, H.L., Allis, C.D., and Hake, S.B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nat. Protoc.* 2, 1445–1457.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., and Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1, 2856–2860.
- Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K.J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.G., and Landegren, U. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat. Methods* 3, 995–1000.
- Solovei, I., Kreysing, M., Lancôt, C., Kösem, S., Peichl, L., Cremer, T., Guck, J., and Joffe, B. (2009). Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* 137, 356–368.
- Song, C.X., Szulwach, K.E., Fu, Y., Dai, Q., Yi, C., Li, X., Li, Y., Chen, C.H., Zhang, W., Jian, X., et al. (2011). Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat. Biotechnol.* 29, 68–72.
- Spruijt, C.G., Gnerlich, F., Smits, A.H., Pfaffeneder, T., Jansen, P.W., Bauer, C., Münzel, M., Wagner, M., Müller, M., Khan, F., et al. (2013). Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell* 152, 1146–1159.
- Szulwach, K.E., Li, X., Li, Y., Song, C.X., Wu, H., Dai, Q., Irier, H., Upadhyay, A.K., Gearing, M., Levey, A.I., et al. (2011). 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat. Neurosci.* 14, 1607–1616.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., and Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930–935.
- Takai, H., Masuda, K., Sato, T., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Koyama-Nasu, R., Nasu-Nishimura, Y., Katou, Y., Ogawa, H., et al. (2014). 5-Hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the CHTOP-methylosome complex. *Cell Rep.* 9, 48–60.
- Voss, T.C., and Hager, G.L. (2014). Dynamic regulation of transcriptional states by chromatin and transcription factors. *Nat. Rev. Genet.* 15, 69–81.
- Williams, K., Christensen, J., Pedersen, M.T., Johansen, J.V., Cloos, P.A., Rappsilber, J., and Helin, K. (2011). TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* 473, 343–348.
- Xiang, M. (2013). Intrinsic control of mammalian retinogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 2519–2532.
- Xu, Y., Wu, F., Tan, L., Kong, L., Xiong, L., Deng, J., Barbera, A.J., Zheng, L., Zhang, H., Huang, S., et al. (2011). Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell* 42, 451–464.
- Xu, Y., Xu, C., Kato, A., Tempel, W., Abreu, J.G., Bian, C., Hu, Y., Hu, D., Zhao, B., Cerovina, T., et al. (2012). Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development. *Cell* 151, 1200–1213.
- Zheng, D., Zhao, K., and Mehler, M.F. (2009). Profiling RE1/REST-mediated histone modifications in the human genome. *Genome Biol.* 10, R9.

4.2. Unveröffentlichte Arbeiten

4.2.1. Das Tet2-Interaktom

Analog zu Tet1 und Tet3 in Kapitel 4.1.1. wurde auch das Interaktom von Tet2 über eine GFP-Tet- gesättigte Co-IP in mESCs und NPCs analysiert. Die Ergebnisse der Experimente sind in Abbildung 4.23 zusammengefasst. Interessanterweise zeigen die *Volcano Plots* fast keine Interaktoren für Tet2.

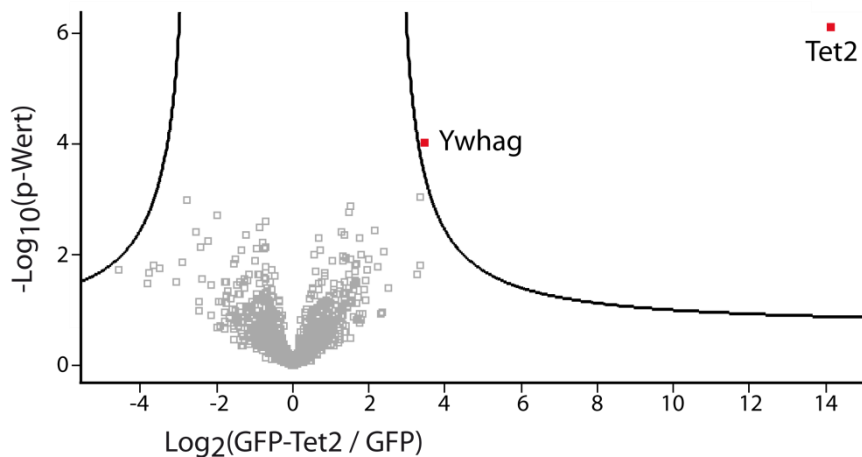


Abbildung 4.23: Interaktionspartner von Tet2 in murinen embryonalen Stammzellen (mESCs). *Volcano Plot* der GFP-Tet2-gesättigten Co-Immunpräzipitation in mESCs identifiziert Ywhag als Interaktor von Tet2 (*False Discovery Rate* (FDR) = 0.05; $s_0 = 2$).

In mESCs kann Ywhag als einziger, statistisch signifikant angereicherter Interaktionspartner identifiziert werden. Dieses Protein ist ein Mitglied der 14-3-3-Proteinfamilie und bereits als Interaktor beschrieben.^[232] 14-3-3-Proteine sind in der Lage, Interaktionen zwischen Proteinen zu regulieren und haben beispielsweise Einfluss auf Signaltransduktion, Zellzyklus und Transkription. Besonders interessant dabei ist, dass die Regulierung der Proteininteraktion oft die Phosphorylierung des Interaktors beinhaltet.^[421] Es könnte daher spekuliert werden, ob Ywhag Tet2 phosphoryliert und dadurch reguliert.

Die Beobachtung, dass Tet2 fast keine Interaktionspartner in mESCs hat, ist überraschend, da Tet1 und Tet2 in diesen Zellen in vergleichbaren Mengen vorhanden sind.^[226] Dies zeigt auch eine, in Abbildung 4.24 dargestellte, Messung der Tet-Level in mESCs mittels RT-qPCR durch Franziska Traube. Trotz ihrer ähnlichen Verteilung, zeigen Tet1 und Tet2 jedoch sehr unterschiedliche Interaktomprofile. So konnte in Kapitel 4.1 gezeigt werden, dass Tet1 eine große Anzahl an interagierenden Proteinen in mESCs hat, während für Tet2 nur Ywhag identifiziert werden konnten.

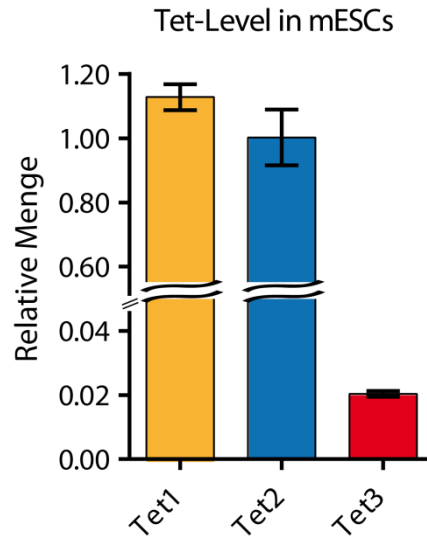


Abbildung 4.24: Tet-Level in murinen embryonalen Stammzellen (mESCs). Eine RT-qPCR-Analyse der mRNA-Level von Tet1, Tet2 und Tet3 in mESCs zeigt, dass die Expression von Tet1 und Tet2 vergleichbar hoch ist. Tet3 wird ebenfalls exprimiert, jedoch in geringeren Mengen als Tet1 und Tet2.

Ein Grund für das Fehlen von Interaktionspartnern für Tet2 könnte sein, dass der exogene Tet2-Köder nicht mit dem bereits in nativen Komplexen vorliegendem endogenen Tet2 konkurrieren kann. Um dies zu untersuchen, wurde die GFP-Tet2-gesättigte Co-IP in Tet TKO mESCs wiederholt. Wieder wurden nur wenige Interaktionspartner identifiziert, wie Abbildung 4.25 zeigt. Endogenes Tet2 scheint somit keine große Wirkung auf die GFP-Tet-gesättigte Co-IP zu haben.

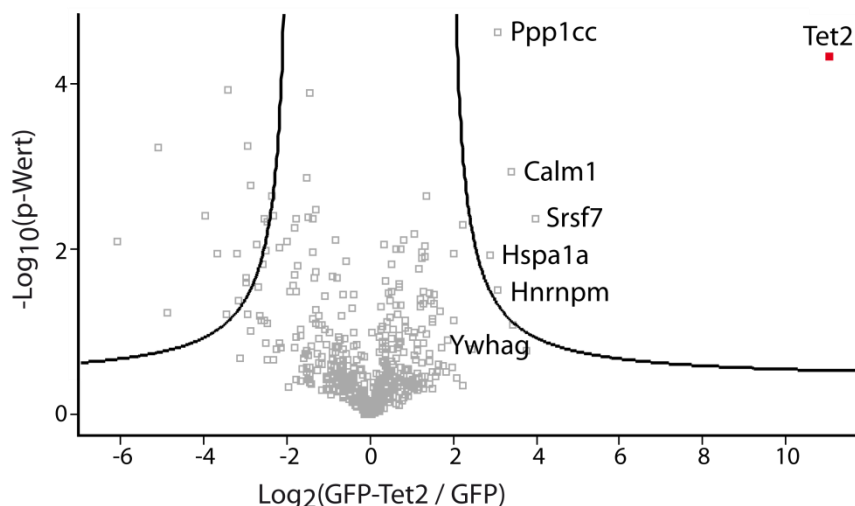


Abbildung 4.25: Volcano Plot der GFP-Tet2-gesättigten Co-Immunpräzipitation in Tet Triple-Knockout-Zellen (False Discovery Rate (FDR) = 0.05; $s_0 = 2$).

Abbildung 4.26 zeigt, dass Tet2 auch in NPCs eine hohe Expressionsrate aufweist. Daher wurde das Interaktom von Tet2 ebenfalls in NPCs mittels modifizierter Co-IP analysiert.

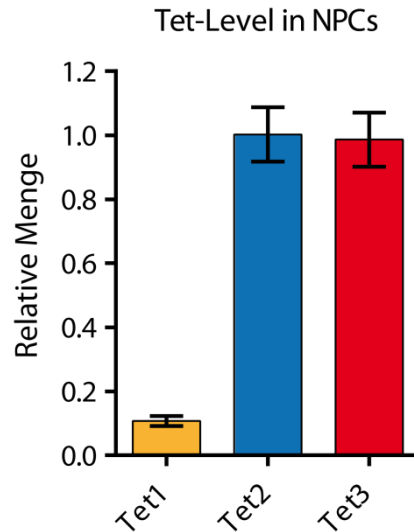


Abbildung 4.26: Tet-Level in neuronalen Vorläuferzellen (NPCs). Eine RT-qPCR-Analyse der mRNA-Level von Tet1, Tet2 und Tet3 in NPCs zeigt, dass die Expression von Tet2 und Tet3 vergleichbar hoch ist. Tet1 wird ebenfalls exprimiert, jedoch in geringeren Mengen als Tet2 und Tet3.

Das Ergebnis ist in Abbildung 4.27 dargestellt. Vergleichbar mit dem Resultat der Co-IP aus mESCs, kann kein Interaktionspartner für Tet2 identifiziert werden. Ywhag ist zwar auch hier angereichert, jedoch nicht stark.

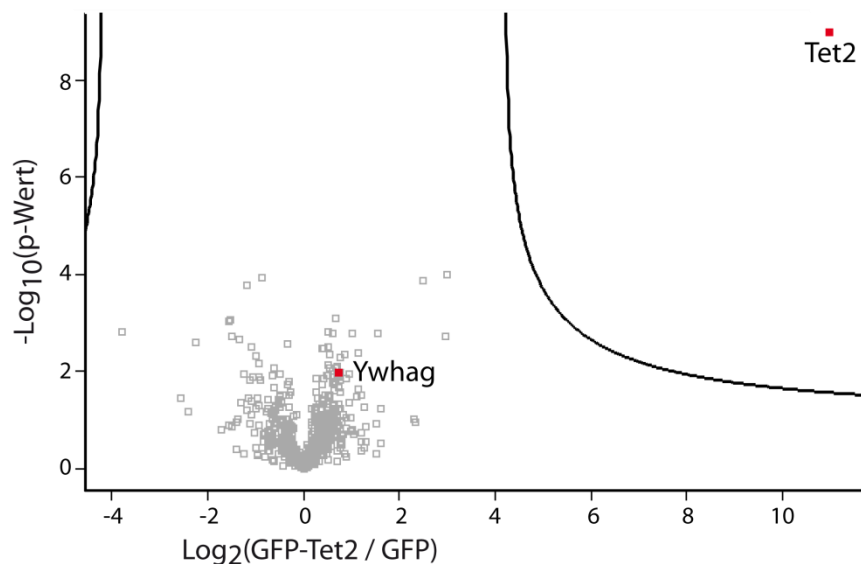


Abbildung 4.27: Interaktionspartner von Tet2 in neuronalen Vorläuferzellen (NPCs). Volcano Plot der GFP-Tet2-gesättigten Co-Immunpräzipitation in NPCs zeigt keine Interaktionspartner für Tet2 (*False Discovery Rate* (FDR) = 0.05; $s_0 = 2$). Die Position von Ywhag im Volcano Plot ist markiert.

Um herauszufinden, warum Tet2 im Vergleich zu Tet1 und Tet3 nur wenige Interaktionspartner hat, wurde die Aktivität der verschiedenen Enzyme in Zusammenarbeit mit Franziska Traube und Edris

Parsa bestimmt. Es wurde jeweils die Aktivität der Tet-Proteine in voller Länge (FL) und die Aktivität deren katalytischer Domäne (CD) alleine gemessen. Hierzu wurde die Oxidation von mC zu hmC in HEK293T-Zellen analysiert, die das zu untersuchende GFP-Tet-Fusionsprotein überexprimieren. Die Ergebnisse des Vergleichs der verschiedenen Tet-Enzyme und deren katalytischer Domänen sind in Abbildung 4.28 zusammengefasst. Interessanterweise ist zu erkennen, dass die nicht-katalytischen Domänen unterschiedlichen Einfluss auf die Oxidationsaktivität der verschiedenen Tet-Proteine haben. Während die Aktivität von Tet2FL im Vergleich zu Tet2CD nicht sinkt, sind die katalytischen Domänen von Tet1 und Tet3 jeweils aktiver, wenn der Rest des Proteins fehlt. Diese Beobachtung lässt auf regulatorische Funktionen der nicht-katalytischen Domänen auf die Oxidationsaktivität schließen. Insbesondere Tet3, welches das umfangreichste Interaktom (siehe Kapitel 4.1) besitzt, weist den größten Unterschied zwischen FL- und CD-Aktivität auf. Diese Korrelation lässt vermuten, dass die katalytische Aktivität stark durch die Proteindomänen außerhalb der katalytischen Domäne beeinflusst wird. Diese Proteindomänen dominieren vermutlich die Interaktionen mit den detektierten Interaktoren, um die Oxidationsreaktion zu kontrollieren. Dies geschieht möglicherweise durch Interaktion dieser Proteindomänen mit regulatorischen Proteinen. Demnach würden die zahlreichen Interaktionspartner von Tet3 eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen FL- und CD-Aktivität liefern. Regulatorische Proteine könnten an Tet3FL, jedoch nicht an Tet3CD binden, und somit die Oxidation beeinflussen. Dass die FL-Aktivität von Tet2 im Vergleich zur CD-Aktivität hingegen nicht verringert ist, könnte somit im Zusammenhang mit der Beobachtung stehen, dass Tet2 mit nur wenigen Proteinen interagiert.

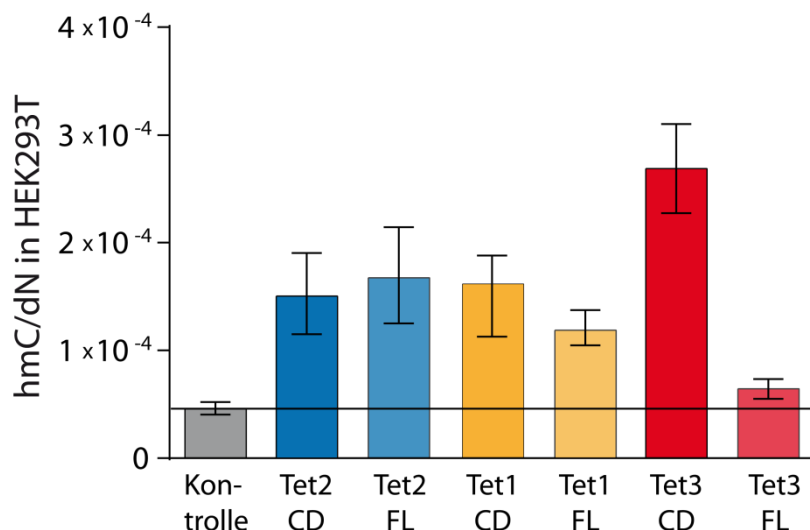


Abbildung 4.28: Aktivität der Tet-Proteine in voller Länge (FL) und deren katalytischer Domäne (CD). Die GFP-Tet-Fusionsproteine wurden jeweils in HEK293T-Zellen produziert, die DNA wurde isoliert und die Menge an 5-Hydroxymethylcytosin (hmC) im Vergleich zu allen Nukleotiden (hmC/dN) bestimmt. Als Kontrolle dienten untransfizierte HEK293T-Zellen.

Zusammenfassend konnten fast keine Interaktionspartner für Tet2 in mESCs und NPCs identifiziert werden. Im Vergleich zu den zahlreichen Interaktoren, die für Tet1 und Tet3 gefunden wurden, ist dieses Ergebnis überraschend. Es könnte bedeuten, dass Tet2 eine spezielle Aktivierung benötigt, die nicht mit dem verwendeten experimentellen Vorgehen imitiert werden konnte. Da ein N-terminales GFP-Fusionskonstrukt verwendet wurde, könnte es auch sein, dass das GFP eine Interaktion mit anderen Proteinen stört. Zudem wäre es möglich, dass Tet2 nur mit sehr niedrig abundanten Proteinen interagiert, die nicht detektiert werden können. Während dem Ablauf der Experimente könnte Tet2 außerdem beeinträchtigt werden und somit nicht mehr in aktiver Form vorliegen, sodass keine Interaktionen zustande kommen. Die *Volcano Plots* der Experimente zeigen jedoch, dass Tet2 in großen Mengen vorliegt. Außerdem ist dieses Szenario unwahrscheinlich, da für die anderen Tet-Enzyme viele Interaktoren mit dieser Methode detektiert werden konnten. Daher ist es wahrscheinlich, dass Tet2 tatsächlich nahezu keine abundanten, starken Interaktionspartner hat.

Folglich könnte Tet2 eher als allgemeine Oxidase funktionieren, die an allen frei zugänglichen mCs im Zellkern aktiv ist. Diese Hypothese wird von Studien unterstützt, die berichten, dass Tet2 die hmC-Level an *Enhancern* und transkribierten Genkörpern in mESCs aufrechterhält.^[422, 92]

Anhand der soeben beschriebenen Beobachtungen zu Tet2 und der Proteomik-Daten aus Kapitel 4.1.1. für Tet1 als auch für Tet3, ergibt sich ein Modell, das in Abbildung 4.29 zusammengefasst ist.

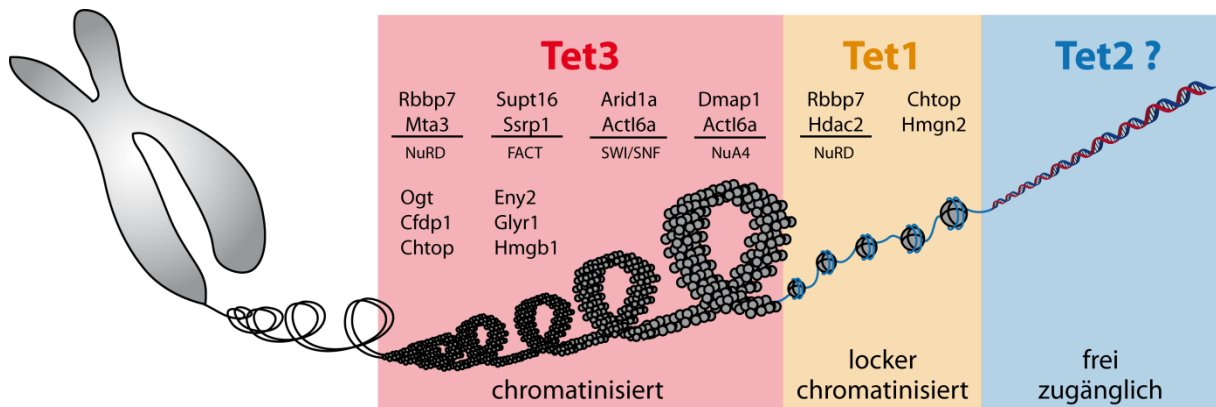


Abbildung 4.29: Die verschiedenen Tet-Enzyme führen ihre Funktion an unterschiedlich chromatinisierter DNA aus. Eine Auswahl der dominierenden Interaktionspartner und zugehörigen Komplexe der Tet-Proteine ist aufgelistet. Tet3 erhält durch die Interaktion mit Chromatin-modifizierenden Komplexen Zugang zu chromatinisierter DNA (Heterochromatin). Tet1 kann mit Hilfe von wenigen Chromatin-assoziierten Proteinen an lockerem Chromatin (Euchromatin) agieren, wohingegen Tet2 an frei zugänglicher DNA aktiv ist.

Dabei zeigt sich, dass Tet2 aufgrund fehlender Interaktoren vermutlich als allgemeine Oxidase agiert, die mC, hmC und fC oxidiert, wenn diese frei zugänglich vorliegen. Tet1 und Tet3 könnten durch ihre Interaktion mit Chromatin-assoziierten Proteinen an chromatinisierter DNA arbeiten. Da im Interaktom von Tet3 besonders viele Chromatin-modifizierende Proteinkomplexe (NuRD, FACT, SWI/SNF, NuA4) zu finden sind, erhält Tet3 vermutlich Zugang zu stark chromatinisierter DNA und ist somit in der Lage, die Oxidationsreaktion im Heterochromatin zu katalysieren. Solch eine Aufteilung würde erklären, warum es drei verschiedene Tet-Enzyme gibt. Sie katalysieren zwar dieselbe Reaktion, allerdings mit Hilfe ihrer Interaktionspartner an unterschiedlichen Regionen der DNA.

4.2.2. Phosphorylierung der Tet-Enzyme beeinflusst deren Aktivität

Da die Phosphorylierung von Enzymen eine wichtige Rolle für die Regulation der Aktivität spielt, ist die Analyse von Phosphorylierungsstellen interessant, um mehr über die Kontrolle der Tet-Aktivität zu erfahren.

Um Phosphorylierungsstellen der Tet-Proteine zu identifizieren, isolierte Edris Parsa Tet1, Tet2, Tet3, sowie die katalytische Domäne von Tet1 (Tet1CD) aus mit dem jeweiligen Konstrukt transfizierten HEK293T-Zellen. Anschließend wurden die Proteine verdaut, phosphorylierte Peptide angereichert und mittels Massenspektrometrie analysiert. Durch dieses Experiment konnte ein „SDS“-Motiv mit hochkonservierten Aminosäuren im aktiven Zentrum der Tet-Enzyme entdeckt werden, das phosphoryliert vorlag. Abbildung 4.30 zeigt das über alle Tet-Proteine konservierte „SDS“-Motiv in rot, wobei phosphoryliert gefundene Serine grün markiert sind. Das erste Serin dieses „SDS“-Motivs konnte hierbei in allen untersuchten Tet-Proteinen im phosphorylierten Zustand nachgewiesen werden. Teilweise unphosphoryliert lag es allerdings nur in Tet2 und Tet3 vor. Es liegt folglich eine gewisse Dynamik in der Phosphorylierung des Motivs.

Tet1	(1873)	QLDEFWSDSEEIYADPSFGGVA
Tet2	(1756)	QEIEYWSDSEHNFQDPCIGGVA
Tet3	(1507)	DEEELWSDSEHNFLDENIGGVA
Tet1CD	(557)	QLDEFWSDSEEIYADPSFGGVA

Abbildung 4.30: Vergleich der Aminosäuresequenzen der verschiedenen Tet-Enzyme und der katalytischen Domäne von Tet1 (Tet1CD) lässt das konservierte „SDS“-Motiv (rot markiert) erkennen. Grün markierte Serine konnten im phosphorylierten Zustand durch Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

Sogar bei der Durchführung des Experiments mit endogenem Tet1 aus mESCs lag das „SDS“-Motiv in Tet1 immer phosphoryliert vor. Um einen größtmöglichen Effekt dieser Phosphorylierung sehen zu können, wurden daher Mutationsstudien für Tet1 durchgeführt. Hierfür wurden von Edris Parsa zwei Mutanten von GFP-Tet1CD hergestellt. Zum einen wurde das erste Serin des „SDS“-Motivs zu einem Alanin mutiert (Mutante S558A) und zum anderen wurde zusätzlich zu dieser Mutation das zweite Serin des „SDS“-Motivs zu einem Isoleucin mutiert (Mutante S560I). Aktivitätstest der S558A-Mutante und des WT-Proteins zeigen tatsächlich große Unterschiede, die in Abbildung 4.31 dargestellt sind. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Aktivität von Tet1CD steigt, wenn das Enzym durch die Alanin-Mutation nicht an Position 558 phosphoryliert werden kann.

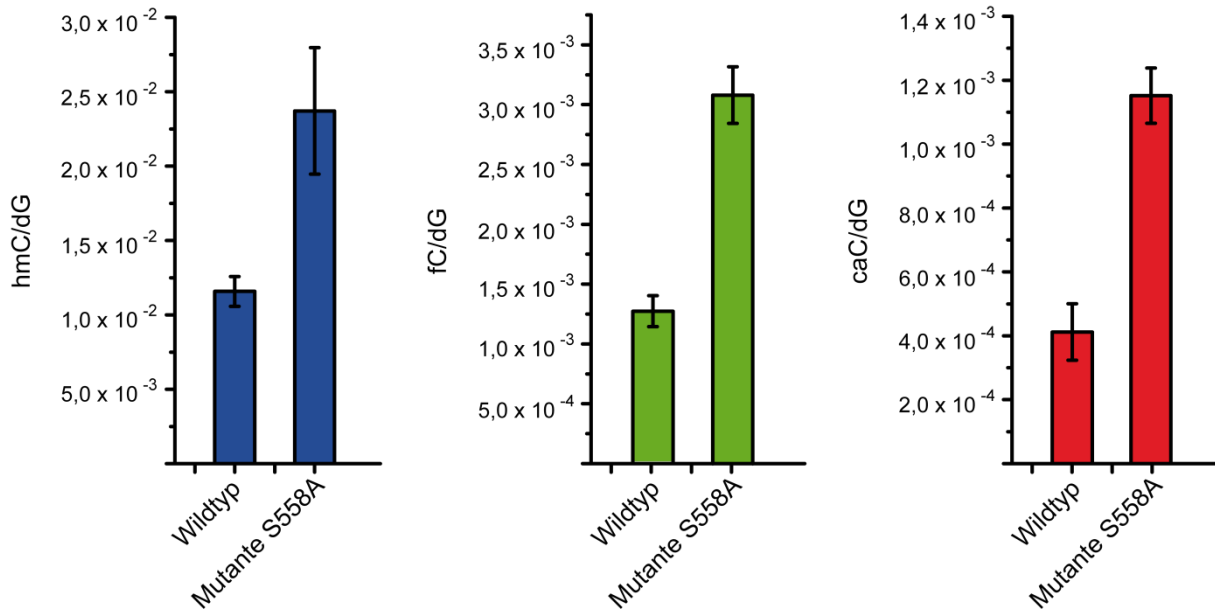


Abbildung 4.31: Vergleich der Tet-Aktivität des Wildtyp-Proteins und der Mutante S558A zeigt eine gesteigerte Aktivität der an Position 558 mutierten katalytischen Domäne von Tet1. Dargestellt sind die Mengen an 5-Hydroxymethylcytosin (hmC) und 5-Formylcytosin (fC) im Vergleich zu allen gemessenen Guaninbasen (dG). Analysiert wurden je drei biologische Replikate, die in technischen Triplikaten gemessen wurden.

Diesen Effekt kann man anhand der Kristallstruktur erklären, die in Abbildung 4.32 gezeigt ist. Das Serin befindet sich in einer Furche, die zum aktiven Zentrum zeigt. Gegenüber befindet sich in der Kristallstruktur ein Lysin. In Abbildung 4.32 deutlich erkennbar, zeigt die Phosphorylierung in diese Furche und ist frei drehbar. Es erscheint plausibel, dass sich die ebenfalls frei drehbare, positiv geladene Lysin-Seitenkette zur negativ geladenen Phosphat-Gruppe dreht und so die Furche blockiert. Dies könnte den Zugang zum aktiven Zentrum stören.

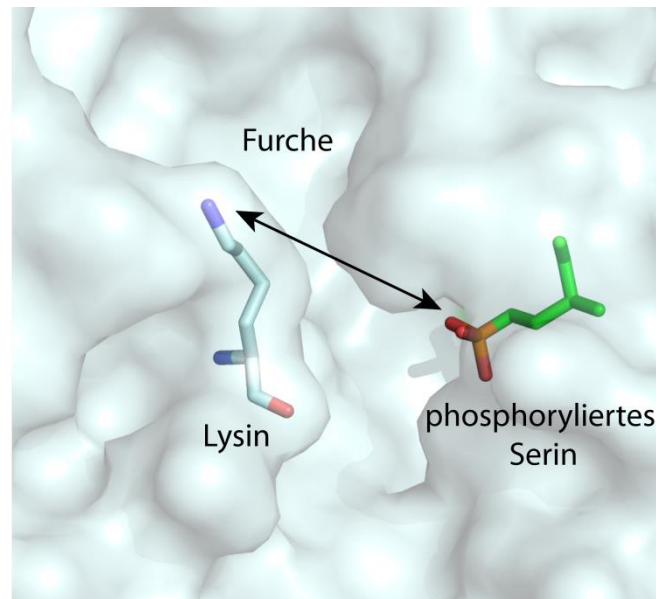


Abbildung 4.32: Die Kristallstruktur der katalytischen Domäne von Tet2 lässt eine Furche mit dem ersten Serin aus dem „SDS“-Motiv auf der einen Seite und einem Lysin auf der anderen Seite erkennen (PDB ID: 4NM6). Die Phosphorylierung des Serins zeigt in diese Furche und ist frei drehbar. Auch die Lysin-Seitenkette ist frei drehbar und so könnte das positiv geladene Lysin mit der negativ geladenen Phosphat-Gruppe interagieren.

Um die verantwortlichen Enzyme für die Phosphorylierung im „SDS“-Motiv zu finden, wurde das Interaktom von WT-Tet1CD und dessen Mutanten untersucht. Dazu wurde die GFP-Tet-gesättigte Co-IP für die jeweiligen Konstrukte mit mESC-Zellkernextrakt durchgeführt und mittels Massenspektrometrie analysiert. In Abbildung 4.33 sind die LFQ-Intensitäten der identifizierten Interaktoren der beiden Mutanten gegeneinander aufgetragen. Die LFQ-Intensitäten der Interaktionspartner aus der WT-Co-IP wurden hierbei subtrahiert, um Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp hervorzuheben. Eine Auswahl an Kinasen und Kinase-assoziierten Proteinen, die entweder besonders an- oder abgereichert sind, ist in der Abbildung rot markiert.

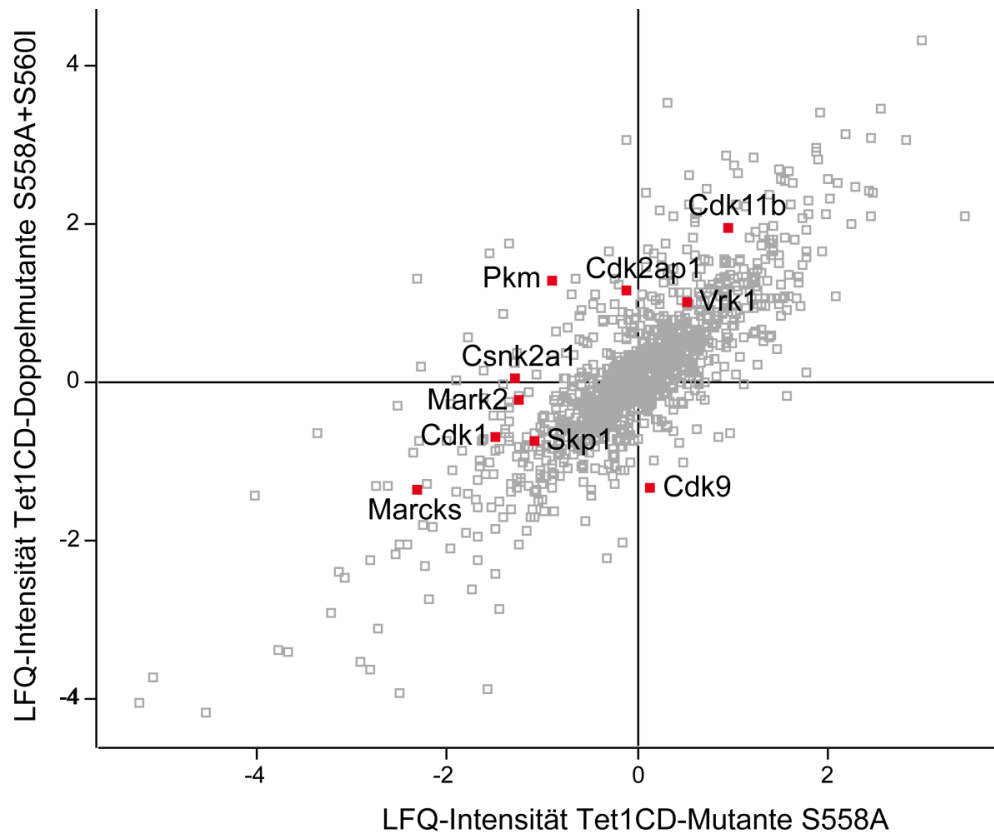


Abbildung 4.33: Scatter Plot der Intensitäten der markierungsfreien Quantifizierung (LFQ) der Mutanten der katalytischen Domäne von Tet1 (Tet1CD). Gegeneinander aufgetragen sind die LFQ-Intensitäten der Proteine aus der GFP-Tet-gesättigten Co-IP mit der Tet1CD-Mutante S558A und der Tet1CD-Doppelmutante S558A+S560I. Diese wurden mit der LFQ-Intensität der Proteine aus der Co-IP mit Wildtyp-Tet1CD subtrahiert. Eine Auswahl an an- und abgereicherten Kinasen ist rot markiert.

Aus dieser Auswahl wurde Cdk11 gewählt, um den Effekt dieser Kinase auf die Tet-Aktivität zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein Cdk11-Knockdown in mESCs mit Hilfe von endogener kleiner eingreifender RNA (*endogenous small interfering RNA*, esiRNA) von Franziska Traube generiert. Die Zellen wurden zudem mit Tet1CD co-transfiziert. Daraufhin testete Edris Parsa die Aktivität von Tet1CD, um den Effekt der Kinase auf die Tet-Aktivität zu analysieren. In Abbildung 4.34 sind die Ergebnisse dieses Knockdown-Experiments dargestellt. Deutlich zu sehen ist eine Erhöhung der Tet-Aktivität durch den Cdk11-Knockdown.

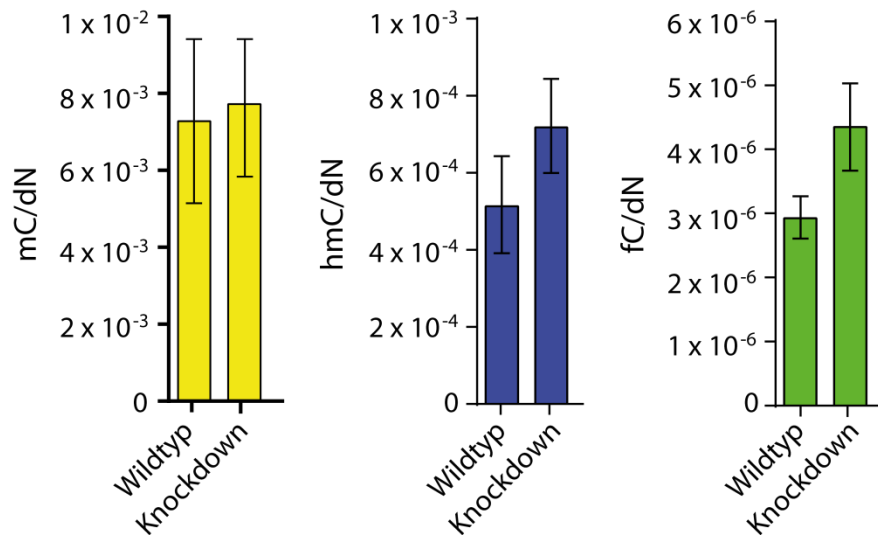


Abbildung 4.34: Vergleich der Tet-Aktivität in Wildtyp- und Cdk11-Knockdown-Zellen zeigt eine gesteigerte Aktivität durch den Einsatz von Cdk11-esiRNA. Dargestellt sind die Mengen an 5-Methylcytosin (mC), 5-Hydroxymethylcytosin (hmC) und 5-Formylcytosin (fC) im Vergleich zu allen Nukleotiden (dN).

4.2.3. Das Tet3^{-CXXC}-Interaktom in der Retina von Mäusen

Um die Interaktionspartner von Tet3 in der Retina von Mäusen zu identifizieren, wurden Tet3-gesättigte Co-IPs mit Zellkernextrakt aus Retinae durchgeführt. Diese Retinae stammten von Mäusen des Stammes Bl6J elf Tage nach der Geburt. Da Tet3^{-CXXC} die dominierende Isoform in neuronalem Gewebe ist,^[208] wurde das Interaktom von GFP-Tet3^{-CXXC} in der Retina bestimmt, wobei GFP als Kontrolle eingesetzt wurde. Die Proben wurden massenspektrometrisch analysiert und mittels LFQ quantifiziert. Das Ergebnis der Analyse des Tet3^{-CXXC}-Interaktoms in der Retina ist in Abbildung 4.35 dargestellt.

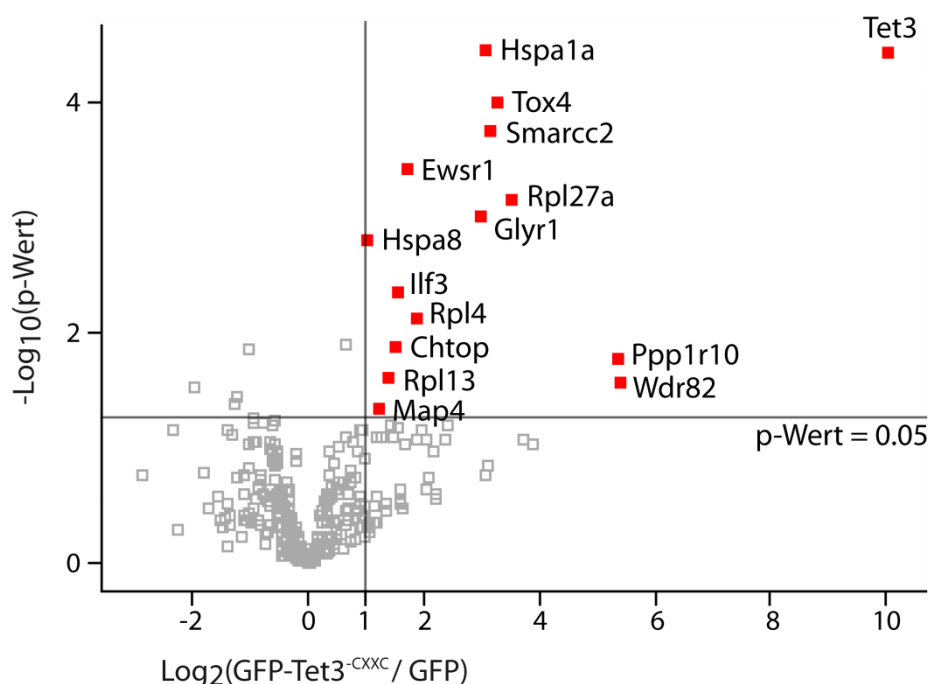


Abbildung 4.35: Das Interaktom von Tet3^{-CXXC} in der Retina der Maus. *Volcano Plots* der GFP-Tet3-gesättigten Co-Immunpräzipitationen mit Zellkernextrakt aus Retinae zeigen signifikant angereicherte Proteine (mindestens zweifach angereichert und p-Wert < 0.05).

Der *Volcano Plot* zeigt deutlich eine signifikante Anreicherung von Proteinen aus Chromatin-assoziierten Komplexen, die bereits in Kapitel 4.1 besprochen wurden. Insbesondere der Ppp1-Komplex mit den Proteinen Tox4, Ppp1r10 und Wdr82 dominiert das Interaktom von Tet3^{-CXXC} in der Retina. Aus dem SWI/SNF-Komplex ist Smarcc2 als Interaktor von Tet3^{-CXXC} zu erkennen. Die Beobachtung von diesen Proteinkomplexen im Interaktom von Tet3^{-CXXC} sowohl in mESCs, NPCs und in der Retina der Maus stärkt die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen der Modifizierung der DNA und der Modifizierung von Chromatin besteht.

Interessant ist auch, dass Chtop und Ilf3 als interagierende Proteine von Tet3^{-CXXC} identifiziert wurden. Chtop wurde ebenfalls bereits als Interaktor von Tet3^{-CXXC}, Tet3 und Tet1 in mESCs entdeckt (siehe Kapitel 4.1). Dieses Protein kann hmC binden und ist Teil des Chtop-Methylosom-Komplexes, welcher zu bestimmten Stellen im Chromosom rekrutiert wird.^[401, 423] Der auf diese Weise mit hmC-assoziierte Komplex kann das Arginin 3 von Histon H4 (H4R3) methylieren und somit die Gentranskription aktivieren.^[401] Die Interaktion von Tet3^{-CXXC} mit Chtop lässt demzufolge erneut eine Verbindung zwischen DNA- und Chromatin-modifizierenden Proteinen vermuten.

Der Chtop-Methylosom-Komplex besteht außerdem aus den Proteinen Mep50, Erh, Prmt5 und Prmt1 (Protein-Arginin-Methyltransferase 1). Obwohl diese nicht signifikant im Tet3^{-CXXC}-Interaktom angereichert sind, ist neben Chtop, dem *Chromatin target of Prmt1*, auch Ilf3 ein Interaktor von Tet3^{-CXXC}. Ilf3 interagiert ebenfalls mit Prmt1 und ist in der Lage, die Aktivität von Prmt1 zu regulieren.^[424-425] Somit ist Ilf3 möglicherweise ein weiterer Mitspieler im Zusammenspiel von DNA- und Chromatin-modifizierenden Enzymen.

Von den restlichen Tet3^{-CXXC}-Interaktoren ist insbesondere Glyr1 interessant, da es an Chromatin rekrutiert wird und H3K36me3 erkennen und binden kann.^[426] Außerdem ist Ewsr1 als möglicher Transkriptionsfaktor unter den Interaktoren hervorzuheben.^[427] Diese Proteine könnten als Interaktoren der Tet-Enzyme einen Einfluss auf die Transkription von Genen ausüben.

Die Häufung an Hitzeschockproteinen (*heat shock proteins*), ribosomalen und strukturellen Proteinen ist eine gängige Kontamination in massenspektrometrisch analysierten Affinitätsaufreinigungen wie der Co-IP. Solche Kontaminanten werden in der *Contaminant Repository for Affinity Purification* (CRAPome) zusammengefasst.^[428]

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Dissertation zahlreiche Interaktionspartner der Tet-Enzyme identifiziert und erforscht werden. Ein Überblick über die interessantesten Tet-Interaktoren ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

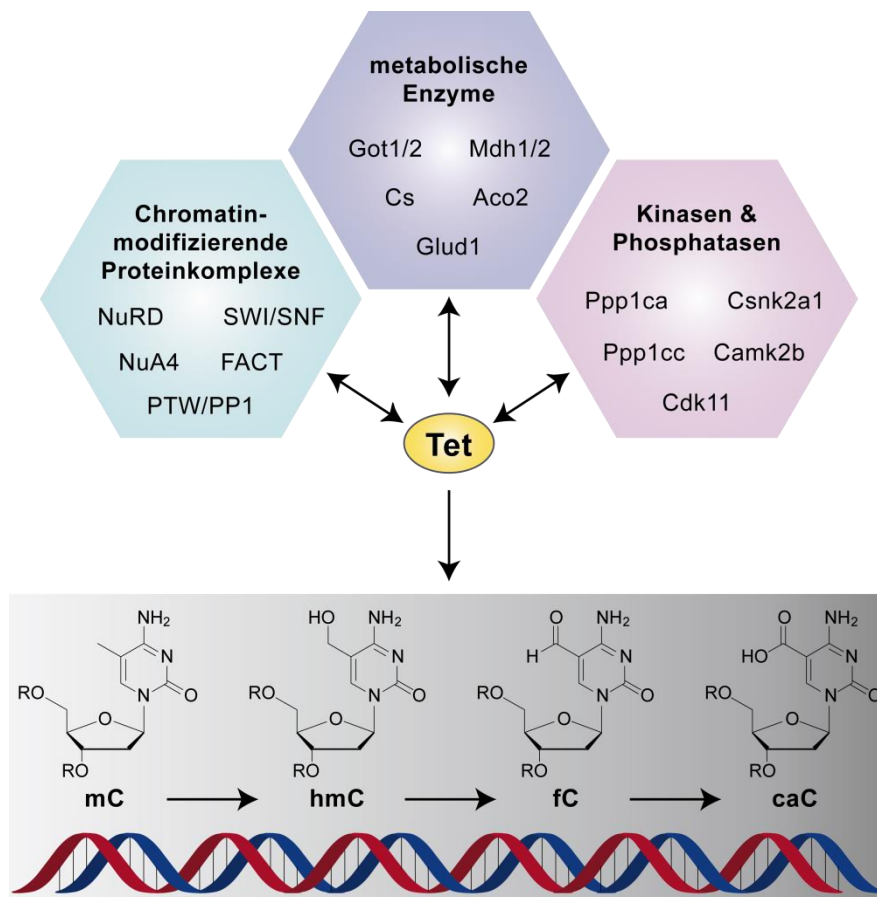


Abbildung 5.1: Tet-Enzyme interagieren mit unterschiedlichen Proteinen, um die Oxidation von 5-Methylcytosin (mC) zu 5-Hydroxymethylcytosin (hmC), 5-Formylcytosin (fC) und 5-Carboxycytosin (caC) zu kontrollieren. Eine Auswahl der Interaktionspartner, welche im Rahmen dieser Dissertation entdeckt wurden, ist gegeben.

Es konnte gezeigt werden, dass Tet3 im Gehirn von Mäusen mit diversen metabolischen Enzymen interagiert. Diese Enzyme sind mit dem mitochondrialen Citratzyklus assoziiert. Daher wurden Lokalisationsstudien durchgeführt, um zu belegen, dass diese Proteine auch im Zellkern vorkommen. Interessant ist allerdings nicht nur, dass diese Enzyme tatsächlich auch im Zellkern lokalisiert sind, sondern dass sie die Tet-Proteine mit α -Ketoglutarat versorgen könnten. Erstaunlicherweise konnten die Citratzyklus-Proteine Mdh1/2, Got1/2, Cs und Aco2 als Tet-Interaktoren nachgewiesen werden, jedoch nicht Idh, das die letzten Reaktionsschritte zum α -Ketoglutarat katalysiert. Daher wurde getestet, ob Oxaloacetat und Isocitrat, die biosynthetischen Vorgängerstufen von α -Ketoglutarat, die

Tet-Aktivität beeinflussen. Tatsächlich zeigte sich, dass diese Metaboliten einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der Tet-Enzyme haben. Sie scheinen hierbei das reaktive Fe^{2+} -Zentrum der Tet-Proteine vor einer Degradierung der DNA zu schützen. Um den Zusammenhang zwischen der Aktivität der Tet-Enzyme und diesen Metaboliten genauer aufzuklären, könnten Metabolomik-Studien durchgeführt werden, um die Level der Metaboliten im Zellkern zu bestimmen. Korrespondieren Schwankungen der Metabolit-Level mit der Tet-Aktivität, könnte dies Aufschluss über die Wirkung dieser Metaboliten geben. Es könnte auch untersucht werden, ob Got1/2 möglicherweise das benötigte Cosubstrat für die Tet-Enzyme liefert, indem das Enzym die Reaktion von Oxaloacetat und Glutamat zu Aspartat und α -Ketoglutarat katalysiert.

Interessant ist auch, dass neben den Proteinen aus dem Citratzyklus auch Glud1 als Tet3-Interaktor im Mäusegehirn identifiziert werden konnte. Da Glud1 α -Ketoglutarat aus dem Neurotransmitter Glutamat generieren kann, könnte dieses Enzym eine Citratzyklus-unabhängige Versorgung der Tet-Proteine mit α -Ketoglutarat gewährleisten. Weitere Experimente konnten zeigen, dass die Interaktion von Glud1 mit Tet3 die Oxidation von mC zu hmC stimuliert. Es scheint folglich, dass das Cosubstrat der Tet-Enzyme aus der Glud1-katalysierten Konversion von Glutamat zu α -Ketoglutarat bereitgestellt wird. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen der Tet-Aktivität und der Gehirnaktivität durch den Neurotransmitter Glutamat besteht. Solch eine Behauptung müsste durch weitere physiologische Experimente bewiesen werden. Beispielsweise könnten Glud-Knockout-Mäuse oder mit Glutamat gefütterte Mäuse analysiert werden. Diese könnten auf Lerndefizite oder Beeinträchtigungen des Gedächtnis hin untersucht werden und die mC-, hmC- und fC-Level quantifiziert werden.

Überdies konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Tet-Enzymen festgestellt werden. Für Tet2 konnten fast keine Interaktionspartner identifiziert werden. Im Gegensatz dazu, wurden viele Interaktoren für Tet1 und Tet3 nachgewiesen. In mESCs und NPCs waren für Tet3 insbesondere zahlreiche Proteine aus Chromatin-modifizierenden Proteinkomplexen signifikant angereichert. Solche Chromatin-assoziierten Proteinkomplexe wie der NuRD-, NuA4-, PTW/PP1-, FACT- und SWI/SNF-Komplex konnten zwar auch als Interaktoren von Tet1 nachgewiesen werden, jedoch waren sie für Tet3 und Tet3^{-CXXC} signifikant stärker vertreten. Auch in der Retina von Mäusen konnte die Interaktion von Tet3^{-CXXC} mit diesen Proteinkomplexen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Tet3 in stärker chromatinisierter DNA, wie sie in Heterochromatin vorliegt, aktiv ist und deshalb mit Chromatin-modifizierenden Proteinkomplexen interagiert. Tet1 wäre demzufolge in weniger stark chromatinisierten Bereichen, dem Euchromatin, aktiv.

Fluoreszenzmikroskopiestudien zeigten, dass Tet3 im Gegensatz zu Tet1 tatsächlich mit dem Heterochromatinmarker H3K9me3 colokalisiert. Ob die Interaktion mit den Chromatin-assoziierten Proteinkomplexen einen funktionellen Zusammenhang mit den Tet-Enzymen hat, müssen weitere Studien auf diesem Gebiet zeigen. So könnte untersucht werden, ob ein *Knockout* oder *Knockdown* spezifischer Chromatin-modifizierender Komplexe Auswirkung auf die hmC-, fC- und caC-Level in der Zelle hat. Solch ein Experiment könnte Aufschluss darüber geben, ob die Aktivität der Tet-Enzyme mit diesen Proteinkomplexen zusammenhängt.

Bei der Analyse von Phosphorylierungen der Tet-Enzyme, konnte ein Serinrest identifiziert werden, dessen Phosphorylierung einen Effekt auf die Tet-Aktivität zeigte. Liegt dieses Serin im phosphorylierten Zustand vor, so ist die Aktivität der Tet-Enzyme gesteigert. Durch die Analyse der Interaktome von Mutanten, denen dieses Serin fehlt, konnte die Kinase Cdk11 entdeckt werden. Ein *Knockdown* dieser Kinase führte zu einer Erhöhung der hmC- und fC-Level in Zellen. Cdk11 könnte daher ein Regulator der Tet-Proteine sein. Ob Cdk11 das beschriebene Serin phosphoryliert und dadurch Einfluss auf die Aktivität der Tet-Enzyme hat, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

6. Abkürzungsverzeichnis

8-oxoG	8-Oxo-7,8-Dihydroguanin
A	Adenin
Aco2	Aconitase
Aid	Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
AID/APOBEC	Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase/Apolipoprotein B mRNA editierendes Enzym katalytisches Polypeptid
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variation</i>)
AP	<i>abasic site</i>
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
bidest.	H ₂ O bidestilliertes Wasser
BP	biologischer Prozess (<i>biological process</i>)
C	Cytosin
caC	5-Carboxycytosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CB	Chemiblocker
CC	zelluläres Kompartiment (<i>cellular compartment</i>)
CD	katalytische Domäne (<i>catalytic domain</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Chtop	<i>Chromatin target of Prmt1</i>
CRAPome	<i>Contaminant Repository for Affinity Purification</i>
Cs	Citratsynthase

CTD	C-terminale Domäne
Cys	Cystein-reiche Region
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dN	Nukleotide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnmt	DNA-Methyltransferase
DSBH	doppelsträngige β -Helix-Region
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation
esiRNA	endogene kleine eingreifende RNA (<i>endogenous small interfering RNA</i>)
FACS	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FBS	fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
fC	5-Formylcytosin
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
FL	volle Länge (<i>full length</i>)
FOX	Forkhead-Box
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
Glud	Glutamatdehydrogenase
GO	Genontologie

Got	Glutamat-Oxaloacetat-Transaminase
H3K36me3	Histon3-Lysin36-Trimethylierung
H3K4	Histon H3 Lysin 4
H4R3	Histon H4 Arginin 3
HDAC	Histondeacetylase
HEK293T-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
hmC	5-Hydroxymethylcytosin
hmU	5-Hydroxymethyluracil
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICC	Immuncytochemie
ID	Identifikator
Idh	Isocitratdehydrogenase
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
KCl	Kaliumchlorid
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometer
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie
LFQ	markierungsfreie Quantifizierung (<i>label-free quantification</i>)
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
Mbd	Methyl-CpG-bindende Domäne
mC	5-Methylcytosin
Mdh	Malatdehydrogenase

MeCP	Methyl-CpG-Bindeprotein
mESC	murine embryonale Stammzelle
MF	molekulare Funktion (<i>molecular function</i>)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localization signal</i>)
nm	Nanometer
NOG	N-Oxalylglycin
NPC	neurale Vorläuferzelle
NuA4	Nukleosom-Acetyltransferase von H4
NuRD	Nukleosom-remodelierende Deacetylase
O-GlcNAc	<i>O-linked</i> β-D-N-Acetylglukosamin
Ogt	O-GlcNAc-Transferase
PB	Phosphatgepufferte Lösung (<i>phosphate buffer</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDB	Proteindatenbank (<i>Protein Data Bank</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
ppm	<i>parts per million</i>
Prmt1	Protein-Arginin-Methyltransferase 1
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RFU	relative Fluoreszenzeinheit (<i>relative fluorescence units</i>)

RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Bereich von Interesse (<i>region of interest</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT-qPCR	<i>Real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SWI/SNF	SWItch/Sucrose nicht gärungsfähig (<i>SWItch/Sucrose Non-Fermentable</i>)
T	Thymin
TAF	TATA-Box-bindendes-Protein-assoziiierter Faktor (<i>TATA-box binding Protein Associated factor</i>)
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
Tdg	Thymin-DNA-Glykosylase
Tet	<i>ten-eleven translocation</i>
TKO	dreifacher <i>Knockout</i> (<i>Triple Knockout</i>)
U	Uracil
UniProt	universelle Proteindatenbank (<i>universal protein database</i>)
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp

7. Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*.
- [2] A. R. Cutter, J. J. Hayes, *FEBS Lett.* **2015**, 589, 2914-2922, *A brief review of nucleosome structure*.
- [3] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, 4th ed., W. H. Freeman, New York, **2000**, *Molecular Cell Biology*.
- [4] D. J. Tremethick, *Cell* **2007**, 128, 651-654, *Higher-Order Structures of Chromatin: The Elusive 30 nm Fiber*.
- [5] T. G. Fazzio, T. Tsukiyama, *Mol. Cell* **2003**, 12, 1333-1340, *Chromatin Remodeling In Vivo: Evidence for a Nucleosome Sliding Mechanism*.
- [6] S. Lomvardas, D. Thanos, *Cell* **2001**, 106, 685-696, *Nucleosome Sliding via TBP DNA Binding In Vivo*.
- [7] J. L. Gutiérrez, M. Chandy, M. J. Carrozza, J. L. Workman, *EMBO J.* **2007**, 26, 730-740, *Activation domains drive nucleosome eviction by SWI/SNF*.
- [8] T. Owen-Hughes, R. T. Utley, J. Côté, C. L. Peterson, J. L. Workman, *Science* **1996**, 273, 513-516, *Persistent Site-Specific Remodeling of a Nucleosome Array by Transient Action of the SWI/SNF Complex*.
- [9] M. A. Schwabish, K. Struhl, *Mol. Cell. Biol.* **2007**, 27, 6987-6995, *The Swi/Snf Complex Is Important for Histone Eviction during Transcriptional Activation and RNA Polymerase II Elongation In Vivo*.
- [10] M. S. Kobor, S. Venkatasubrahmanyam, M. D. Meneghini, J. W. Gin, J. L. Jennings, A. J. Link, H. D. Madhani, J. Rine, *PLoS Biol.* **2004**, 2, e131, *A Protein Complex Containing the Conserved Swi2/Snf2-Related ATPase Swr1p Deposits Histone Variant H2A.Z into Euchromatin*.
- [11] N. J. Krogan, M.-C. Keogh, N. Datta, C. Sawa, O. W. Ryan, H. Ding, R. A. Haw, J. Pootoolal, A. Tong, V. Canadien, D. P. Richards, X. Wu, A. Emili, T. R. Hughes, S. Buratowski, J. F. Greenblatt, *Mol. Cell* **2003**, 12, 1565-1576, *A Snf2 Family ATPase Complex Required for Recruitment of the Histone H2A Variant Htz1*.
- [12] G. Mizuguchi, X. Shen, J. Landry, W.-H. Wu, S. Sen, C. Wu, *Science* **2004**, 303, 343-348, *ATP-Driven Exchange of Histone H2AZ Variant Catalyzed by SWR1 Chromatin Remodeling Complex*.
- [13] H. Zhang, D. N. Roberts, B. R. Cairns, *Cell* **2005**, 123, 219-231, *Genome-Wide Dynamics of Htz1, a Histone H2A Variant that Poises Repressed/Basal Promoters for Activation through Histone Loss*.
- [14] R. Belotserkovskaya, S. Oh, V. A. Bondarenko, G. Orphanides, V. M. Studitsky, D. Reinberg, *Science* **2003**, 301, 1090-1093, *FACT Facilitates Transcription-Dependent Nucleosome Alteration*.

- [15] G. Orphanides, G. LeRoy, C.-H. Chang, D. S. Luse, D. Reinberg, *Cell* **1998**, 92, 105-116, *FACT, a Factor that Facilitates Transcript Elongation through Nucleosomes*.
- [16] L. Mariño-Ramírez, M. G. Kann, B. A. Shoemaker, D. Landsman, *Expert Rev. Proteomics* **2005**, 2, 719-729, *Histone structure and nucleosome stability*.
- [17] S. Allard, R. T. Utley, J. Savard, A. Clarke, P. Grant, C. J. Brandl, L. Pillus, J. L. Workman, J. Côté, *EMBO J.* **1999**, 18, 5108-5119, *NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p*.
- [18] P. Zegerman, B. Canas, D. Pappin, T. Kouzarides, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 11621-11624, *Histone H3 Lysine 4 Methylation Disrupts Binding of Nucleosome Remodeling and Deacetylase (NuRD) Repressor Complex*.
- [19] Y. Xue, J. Wong, G. T. Moreno, M. K. Young, J. Côté, W. Wang, *Mol. Cell* **1998**, 2, 851-861, *NURD, a Novel Complex with Both ATP-Dependent Chromatin-Remodeling and Histone Deacetylase Activities*.
- [20] S. Bheemanaik, Yeturu V. R. Reddy, Desirazu N. Rao, *Biochem. J.* **2006**, 399, 177-190, *Structure, function and mechanism of exocyclic DNA methyltransferases*.
- [21] A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2002**, 3, 274-293, *Beyond Watson and Crick: DNA Methylation and Molecular Enzymology of DNA Methyltransferases*.
- [22] R. D. Hotchkiss, *J. Biol. Chem.* **1948**, 175, 315-332, *The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography*.
- [23] G. R. Wyatt, *Nature* **1950**, 166, 237-238, *Occurrence of 5-Methyl-Cytosine in Nucleic Acids*.
- [24] Z. D. Smith, A. Meissner, *Nat. Rev. Genet.* **2013**, 14, 204-220, *DNA methylation: roles in mammalian development*.
- [25] A. M. Deaton, A. Bird, *Genes Dev.* **2011**, 25, 1010-1022, *CpG islands and the regulation of transcription*.
- [26] P. A. Jones, *Nat. Rev. Genet.* **2012**, 13, 484-492, *Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond*.
- [27] R. Bonasio, S. Tu, D. Reinberg, *Science* **2010**, 330, 612-616, *Molecular Signals of Epigenetic States*.
- [28] H. Cedar, Y. Bergman, *Nat. Rev. Genet.* **2009**, 10, 295-304, *Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms*.
- [29] P. A. Jones, D. Takai, *Science* **2001**, 293, 1068-1070, *The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics*.
- [30] J. A. Law, S. E. Jacobsen, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, 11, 204-220, *Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals*.
- [31] M. Ehrlich, M. A. Gama-Sosa, L.-H. Huang, R. M. Midgett, K. C. Kuo, R. A. McCune, C. Gehrke, *Nucleic Acids Res.* **1982**, 10, 2709-2721, *Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells*.

- [32] D. Globisch, M. Münzel, M. Müller, S. Michalakakis, M. Wagner, S. Koch, T. Brückl, M. Biel, T. Carell, *PLoS One* **2010**, 5, e15367, *Tissue Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine and Search for Active Demethylation Intermediates*.
- [33] R. Lister, M. Pelizzola, R. H. Dowen, R. D. Hawkins, G. Hon, J. Tonti-Filippini, J. R. Nery, L. Lee, Z. Ye, Q.-M. Ngo, L. Edsall, J. Antosiewicz-Bourget, R. Stewart, V. Ruotti, A. H. Millar, J. A. Thomson, B. Ren, J. R. Ecker, *Nature* **2009**, 462, 315-322, *Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences*.
- [34] R. Z. Jurkowska, T. P. Jurkowski, A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2011**, 12, 206-222, *Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases*.
- [35] G. Liang, M. F. Chan, Y. Tomigahara, Y. C. Tsai, F. A. Gonzales, E. Li, P. W. Laird, P. A. Jones, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, 22, 480-491, *Cooperativity between DNA Methyltransferases in the Maintenance Methylation of Repetitive Elements*.
- [36] M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, E. Li, *Cell* **1999**, 99, 247-257, *DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development*.
- [37] S. Feng, S. E. Jacobsen, W. Reik, *Science* **2010**, 330, 622-627, *Epigenetic Reprogramming in Plant and Animal Development*.
- [38] W. Dean, F. Santos, M. Stojkovic, V. Zakhartchenko, J. Walter, E. Wolf, W. Reik, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98, 13734-13738, *Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos*.
- [39] H. Fulka, M. Mrazek, O. Tepla, J. Fulka, *Reproduction* **2004**, 128, 703-708, *DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos*.
- [40] M. Gehring, W. Reik, S. Henikoff, *Trends Genet.* **2009**, 25, 82-90, *DNA demethylation by DNA repair*.
- [41] K. Iqbal, S.-G. Jin, G. P. Pfeifer, P. E. Szabó, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, 108, 3642-3647, *Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine*.
- [42] W. Mayer, A. Niveleau, J. Walter, R. Fundele, T. Haaf, *Nature* **2000**, 403, 501-502, *Embryogenesis: Demethylation of the zygotic paternal genome*.
- [43] J. Oswald, S. Engemann, N. Lane, W. Mayer, A. Olek, R. Fundele, W. Dean, W. Reik, J. Walter, *Curr. Biol.* **2000**, 10, 475-478, *Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote*.
- [44] M. A. Surani, K. Hayashi, P. Hajkova, *Cell* **2007**, 128, 747-762, *Genetic and Epigenetic Regulators of Pluripotency*.
- [45] H. Wu, Y. Zhang, *Cell* **2014**, 156, 45-68, *Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions*.
- [46] P.-A. Defossez, I. Stancheva, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2011**, 101, 377-398, *Biological functions of methyl-CpG-binding proteins*.
- [47] M. Iurlaro, G. Ficiz, D. Oxley, E.-A. Raiber, M. Bachman, M. J. Booth, S. Andrews, S. Balasubramanian, W. Reik, *Genome Biol.* **2013**, 14, R119-R119, *A screen for*

- hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation.*
- [48] C. G. Spruijt, F. Gnerlich, A. H. Smits, T. Pfaffeneder, P. W. T. C. Jansen, C. Bauer, M. Münzel, M. Wagner, M. Müller, F. Khan, H. C. Eberl, A. Mensinga, A. B. Brinkman, K. Lephikov, U. Müller, J. Walter, R. Boelens, H. van Ingen, H. Leonhardt, T. Carell, M. Vermeulen, *Cell* **2013**, *152*, 1146-1159, *Dynamic Readers for 5-(Hydroxy)Methylcytosine and Its Oxidized Derivatives.*
 - [49] Y. Zhang, H.-H. Ng, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, A. Bird, D. Reinberg, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1924-1935, *Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation.*
 - [50] M. Bostick, J. K. Kim, P.-O. Estève, A. Clark, S. Pradhan, S. E. Jacobsen, *Science* **2007**, *317*, 1760-1764, *UHRF1 Plays a Role in Maintaining DNA Methylation in Mammalian Cells.*
 - [51] G. Pichler, P. Wolf, C. S. Schmidt, D. Meilinger, K. Schneider, C. Frauer, K. Fellingner, A. Rottach, H. Leonhardt, *J. Cell. Biochem.* **2011**, *112*, 2585-2593, *Cooperative DNA and histone binding by Uhrf2 links the two major repressive epigenetic pathways.*
 - [52] J. Zhang, Q. Gao, P. Li, X. Liu, Y. Jia, W. Wu, J. Li, S. Dong, H. Koseki, J. Wong, *Cell Res.* **2011**, *21*, 1723-1739, *S phase-dependent interaction with DNMT1 dictates the role of UHRF1 but not UHRF2 in DNA methylation maintenance.*
 - [53] H. Hui Ng, A. Bird, *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 121-126, *Histone deacetylases: silencers for hire.*
 - [54] P. L. Jones, G. C. Jan Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, A. P. Wolffe, *Nat. Genet.* **1998**, *19*, 187-191, *Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription.*
 - [55] H.-H. Ng, P. Jeppesen, A. Bird, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 1394-1406, *Active Repression of Methylated Genes by the Chromosomal Protein MBD1.*
 - [56] J. C. Rice, C. D. Allis, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 263-273, *Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation.*
 - [57] Y.-F. He, B.-Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, X. Li, Q. Dai, C.-X. Song, K. Zhang, C. He, G.-L. Xu, *Science* **2011**, *333*, 1303-1307, *Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA.*
 - [58] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, *Science* **2011**, *333*, 1300-1303, *Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine.*
 - [59] S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929-930, *The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain.*
 - [60] M. Tahiliani, K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind, A. Rao, *Science* **2009**, *324*, 930-935, *Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1.*
 - [61] G. R. Wyatt, S. S. Cohen, *Nature* **1952**, *170*, 1072-1073, *A New Pyrimidine Base from Bacteriophage Nucleic Acids.*

- [62] G. R. Wyatt, S. S. Cohen, *Biochem. J.* **1953**, *55*, 774-782, *The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine.*
- [63] M. Münzel, D. Globisch, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 6460-6468, *5-Hydroxymethylcytosine, the Sixth Base of the Genome.*
- [64] H. Chen, S. Dzitoyeva, H. Manev, *Restor. Neurol. Neurosci.* **2012**, *30*, 237-245, *Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in the mouse hippocampus.*
- [65] L. Chouliaras, D. L.A. van den Hove, G. Kenis, S. Keitel, P. R. Hof, J. van Os, H. W.M. Steinbusch, C. Schmitz, B. P.F. Rutten, *Curr. Alzheimer Res.* **2012**, *9*, 536-544, *Age-Related Increase in Levels of 5-Hydroxymethylcytosine in Mouse Hippocampus is Prevented by Caloric Restriction.*
- [66] N. Coppieters, B. V. Dieriks, C. Lill, R. L. M. Faull, M. A. Curtis, M. Dragunow, *Neurobiol. Aging* **2014**, *35*, 1334-1344, *Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain.*
- [67] S. F. Field, D. Beraldi, M. Bachman, S. K. Stewart, S. Beck, S. Balasubramanian, *PLoS One* **2015**, *10*, e0118202, *Accurate Measurement of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine in Human Cerebellum DNA by Oxidative Bisulfite on an Array (OxBS-Array).*
- [68] M. A. Hahn, R. Qiu, X. Wu, A. X. Li, H. Zhang, J. Wang, J. Jui, S.-G. Jin, Y. Jiang, G. P. Pfeifer, Q. Lu, *Cell Rep.* **2013**, *3*, 291-300, *Dynamics of 5-Hydroxymethylcytosine and Chromatin Marks in Mammalian Neurogenesis.*
- [69] S.-G. Jin, X. Wu, A. X. Li, G. P. Pfeifer, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain.*
- [70] T. F. J. Kraus, V. Guibourt, H. A. Kretschmar, *J. Neural Transm.* **2015**, *122*, 1035-1043, *5-Hydroxymethylcytosine, the "Sixth Base", during brain development and ageing.*
- [71] M. Münzel, D. Globisch, T. Brückl, M. Wagner, V. Welzmler, S. Michalakis, M. Müller, M. Biel, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 5375-5377, *Quantification of the Sixth DNA Base Hydroxymethylcytosine in the Brain.*
- [72] C.-X. Song, K. E. Szulwach, Y. Fu, Q. Dai, C. Yi, X. Li, Y. Li, C.-H. Chen, W. Zhang, X. Jian, J. Wang, L. Zhang, T. J. Looney, B. Zhang, L. A. Godley, L. M. Hicks, B. T. Lahn, P. Jin, C. He, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 68-72, *Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine.*
- [73] K. E. Szulwach, X. Li, Y. Li, C.-X. Song, J. W. Han, S. Kim, S. Namburi, K. Hermetz, J. J. Kim, M. K. Rudd, Y.-S. Yoon, B. Ren, C. He, P. Jin, *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1002154, *Integrating 5-Hydroxymethylcytosine into the Epigenomic Landscape of Human Embryonic Stem Cells.*
- [74] M. Wagner, J. Steinbacher, T. F. J. Kraus, S. Michalakis, B. Hackner, T. Pfaffeneder, A. Perera, M. Müller, A. Giese, H. A. Kretschmar, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 12511-12514, *Age-Dependent Levels of 5-Methyl-, 5-Hydroxymethyl-, and 5-Formylcytosine in Human and Mouse Brain Tissues.*
- [75] T. Wang, Q. Pan, L. Lin, K. E. Szulwach, C.-X. Song, C. He, H. Wu, S. T. Warren, P. Jin, R. Duan, X. Li, *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *Genome-wide DNA hydroxymethylation changes are associated with neurodevelopmental genes in the developing human cerebellum.*

- [76] L. Wen, X. Li, L. Yan, Y. Tan, R. Li, Y. Zhao, Y. Wang, J. Xie, Y. Zhang, C. Song, M. Yu, X. Liu, P. Zhu, X. Li, Y. Hou, H. Guo, X. Wu, C. He, R. Li, F. Tang, J. Qiao, *Genome Biol.* **2014**, *15*, 1-17, *Whole-genome analysis of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine at base resolution in the human brain.*
- [77] R. Lister, E. A. Mukamel, J. R. Nery, M. Urich, C. A. Puddifoot, N. D. Johnson, J. Lucero, Y. Huang, A. J. Dwork, M. D. Schultz, M. Yu, J. Tonti-Filippini, H. Heyn, S. Hu, J. C. Wu, A. Rao, M. Esteller, C. He, F. G. Haghighi, T. J. Sejnowski, M. M. Behrens, J. R. Ecker, *Science* **2013**, *341*, *Global Epigenomic Reconfiguration During Mammalian Brain Development.*
- [78] T. F. J. Kraus, D. Globisch, M. Wagner, S. Eigenbrod, D. Widmann, M. Münzel, M. Müller, T. Pfaffeneder, B. Hackner, W. Feiden, U. Schüller, T. Carell, H. A. Kretzschmar, *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 1577-1590, *Low values of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), the “sixth base,” are associated with anaplasia in human brain tumors.*
- [79] J. U. Guo, Y. Su, C. Zhong, G. L. Ming, H. Song, *Cell* **2011**, *145*, 423-434, *Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain.*
- [80] G. A. Kaas, C. Zhong, D. E. Eason, D. L. Ross, R. V. Vachhani, G. L. Ming, J. R. King, H. Song, J. D. Sweatt, *Neuron* **2013**, *79*, 1086-1093, *TET1 controls CNS 5-methylcytosine hydroxylation, active DNA demethylation, gene transcription, and memory formation.*
- [81] X. Li, W. Wei, Q.-Y. Zhao, J. Widagdo, D. Baker-Andresen, C. R. Flavell, A. D’Alessio, Y. Zhang, T. W. Bredy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 7120-7125, *Neocortical Tet3-mediated accumulation of 5-hydroxymethylcytosine promotes rapid behavioral adaptation.*
- [82] H. Yu, Y. Su, J. Shin, C. Zhong, J. U. Guo, Y.-L. Weng, F. Gao, D. H. Geschwind, G. Coppola, G.-I. Ming, *Nat. Neurosci.* **2015**, *18*, 836-843, *Tet3 regulates synaptic transmission and homeostatic plasticity via DNA oxidation and repair.*
- [83] M. J. Booth, M. R. Branco, G. Ficz, D. Oxley, F. Krueger, W. Reik, S. Balasubramanian, *Science* **2012**, *336*, 934-937, *Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution.*
- [84] G. Ficz, M. R. Branco, S. Seisenberger, F. Santos, F. Krueger, T. A. Hore, C. J. Marques, S. Andrews, W. Reik, *Nature* **2011**, *473*, 398-402, *Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation.*
- [85] W. A. Pastor, U. J. Pape, Y. Huang, H. R. Henderson, R. Lister, M. Ko, E. M. McLoughlin, Y. Brudno, S. Mahapatra, P. Kapranov, M. Tahiliani, G. Q. Daley, X. S. Liu, J. R. Ecker, P. M. Milos, S. Agarwal, A. Rao, *Nature* **2011**, *473*, 394-397, *Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells.*
- [86] C.-X. Song, T. A. Clark, X.-Y. Lu, A. Kislyuk, Q. Dai, S. W. Turner, C. He, J. Korlach, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 75-77, *Sensitive and specific single-molecule sequencing of 5-hydroxymethylcytosine.*
- [87] C.-X. Song, Y. Sun, Q. Dai, X.-Y. Lu, M. Yu, C.-G. Yang, C. He, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1682-1685, *Detection of 5-Hydroxymethylcytosine in DNA by Transferring a Keto-Glucose by Using T4 Phage β -Glucosyltransferase.*
- [88] K. Williams, J. Christensen, M. T. Pedersen, J. V. Johansen, P. A. C. Cloos, J. Rappsilber, K. Helin, *Nature* **2011**, *473*, 343-348, *TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity.*

- [89] H. Wu, A. C. D'Alessio, S. Ito, Z. Wang, K. Cui, K. Zhao, Y. E. Sun, Y. Zhang, *Genes Dev.* **2011**, *25*, 679-684, *Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells.*
- [90] M. Yu, Gary C. Hon, Keith E. Szulwach, C.-X. Song, L. Zhang, A. Kim, X. Li, Q. Dai, Y. Shen, B. Park, J.-H. Min, P. Jin, B. Ren, C. He, *Cell* **2012**, *149*, 1368-1380, *Base-Resolution Analysis of 5-Hydroxymethylcytosine in the Mammalian Genome.*
- [91] B. M. Colquitt, W. E. Allen, G. Barnea, S. Lomvardas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 14682-14687, *Alteration of genic 5-hydroxymethylcytosine patterning in olfactory neurons correlates with changes in gene expression and cell identity.*
- [92] Y. Huang, L. Chavez, X. Chang, X. Wang, W. A. Pastor, J. Kang, J. A. Zepeda-Martínez, U. J. Pape, S. E. Jacobsen, B. Peters, A. Rao, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 1361-1366, *Distinct roles of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet2 in mouse embryonic stem cells.*
- [93] M. Mellén, P. Ayata, S. Dewell, S. Kriaucionis, N. Heintz, *Cell* **2012**, *151*, 1417-1430, *MeCP2 Binds to 5hmC Enriched within Active Genes and Accessible Chromatin in the Nervous System.*
- [94] J. Robertson, A. B. Robertson, A. Klungland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *411*, 40-43, *The presence of 5-hydroxymethylcytosine at the gene promoter and not in the gene body negatively regulates gene expression.*
- [95] H. Wu, A. C. D'Alessio, S. Ito, Z. Wang, K. Cui, K. Zhao, Y. E. Sun, Y. Zhang, *Genes Dev.* **2011**, *25*, *Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells.*
- [96] J. Otani, H. Kimura, J. Sharif, T. A. Endo, Y. Mishima, T. Kawakami, H. Koseki, M. Shirakawa, I. Suetake, S. Tajima, *PLoS One* **2013**, *8*, e82961, *Cell Cycle-Dependent Turnover of 5-Hydroxymethyl Cytosine in Mouse Embryonic Stem Cells.*
- [97] M. Bachman, S. Uribe-Lewis, X. Yang, M. Williams, A. Murrell, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 1049-1055, *5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification.*
- [98] S. C. Wu, Y. Zhang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 607-620, *Active DNA demethylation: many roads lead to Rome.*
- [99] C. G. Lian, Y. Xu, C. Ceol, F. Wu, A. Larson, K. Dresser, W. Xu, L. Tan, Y. Hu, Q. Zhan, C. W. Lee, D. Hu, B. Q. Lian, S. Kleffel, Y. Yang, J. Neiswender, A. J. Khorasani, R. Fang, C. Lezcano, L. M. Duncan, R. A. Scolyer, J. F. Thompson, H. Kakavand, Y. Houvras, L. I. Zon, M. C. Mihm, Jr., U. B. Kaiser, T. Schatton, B. A. Woda, G. F. Murphy, Y. G. Shi, *Cell* **2012**, *150*, 1135-1146, *Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma.*
- [100] C. Liu, L. Liu, X. Chen, J. Shen, J. Shan, Y. Xu, Z. Yang, L. Wu, F. Xia, P. Bie, Y. Cui, X.-w. Bian, C. Qian, *PLoS One* **2013**, *8*, e62828, *Decrease of 5-Hydroxymethylcytosine Is Associated with Progression of Hepatocellular Carcinoma through Downregulation of TET1.*
- [101] M. E. Figueroa, O. Abdel-Wahab, C. Lu, P. S. Ward, J. Patel, A. Shih, Y. Li, N. Bhagwat, A. Vasanthakumar, H. F. Fernandez, M. S. Tallman, Z. Sun, K. Wolniak, J. K. Peeters, W. Liu, S. E. Choe, V. R. Fantin, E. Paietta, B. Lowenberg, J. D. Licht, L. A. Godley, R. Delwel, P. J. Valk, C. B. Thompson, R. L. Levine, A. Melnick, *Cancer Cell* **2010**, *18*, 553-567, *Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation.*

- [102] M. C. Haffner, A. Chaux, A. K. Meeker, D. Esopi, J. Gerber, L. G. Pellakuru, A. Toubaji, P. Argani, C. Iacobuzio-Donahue, W. G. Nelson, G. J. Netto, A. DeMarzo, S. Yegnasubramanian, *Oncotarget* **2011**, 2, 627-637, *Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers.*
- [103] C. H. Hsu, K. L. Peng, M. L. Kang, Y. R. Chen, Y. C. Yang, C. H. Tsai, C. S. Chu, Y. M. Jeng, Y. T. Chen, F. M. Lin, H. D. Huang, Y. Y. Lu, Y. C. Teng, S. T. Lin, R. K. Lin, F. M. Tang, S. B. Lee, H. M. Hsu, J. C. Yu, P. W. Hsiao, L. J. Juan, *Cell Rep.* **2012**, 2, 568-579, *TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases.*
- [104] S. G. Jin, Y. Jiang, R. Qiu, T. A. Rauch, Y. Wang, G. Schackert, D. Krex, Q. Lu, G. P. Pfeifer, *Cancer Res.* **2011**, 71, 7360-7365, *5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations.*
- [105] M. Ko, Y. Huang, A. M. Jankowska, U. J. Pape, M. Tahiliani, H. S. Bandukwala, J. An, E. D. Lamperti, K. P. Koh, R. Ganetzky, X. S. Liu, L. Aravind, S. Agarwal, J. P. Maciejewski, A. Rao, *Nature* **2010**, 468, 839-843, *Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2.*
- [106] N. Konstandin, S. Bultmann, A. Szwagierczak, A. Dufour, B. Ksienzyk, F. Schneider, T. Herold, M. Mulaw, P. M. Kakadia, S. Schneider, K. Spiekermann, H. Leonhardt, S. K. Bohlander, *Leukemia* **2011**, 25, 1649-1652, *Genomic 5-hydroxymethylcytosine levels correlate with TET2 mutations and a distinct global gene expression pattern in secondary acute myeloid leukemia.*
- [107] W. Li, M. Liu, *J. Nucleic Acids* **2011**, 2011, 870726, *Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues.*
- [108] R. Uchiyama, H. Uhara, A. Uchiyama, E. Ogawa, Y. Takazawa, A. Ashida, H. Koga, K. Hayashi, Y. Kuniwa, R. Okuyama, *J. Dermatol. Sci.* **2014**, 73, 161-163, *5-Hydroxymethylcytosine as a useful marker to differentiate between malignant melanomas and benign melanocytic nevi.*
- [109] W. Xu, H. Yang, Y. Liu, Y. Yang, P. Wang, S.-H. Kim, S. Ito, C. Yang, P. Wang, M.-T. Xiao, L.-x. Liu, W.-q. Jiang, J. Liu, J.-y. Zhang, B. Wang, S. Frye, Y. Zhang, Y.-h. Xu, Q.-y. Lei, K.-L. Guan, S.-m. Zhao, Y. Xiong, *Cancer Cell* **2011**, 19, 17-30, *Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases.*
- [110] H. Yang, Y. Liu, F. Bai, J. Y. Zhang, S. H. Ma, J. Liu, Z. D. Xu, H. G. Zhu, Z. Q. Ling, D. Ye, K. L. Guan, Y. Xiong, *Oncogene* **2013**, 32, 663-669, *Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation.*
- [111] L. Lopez-Serra, M. Esteller, *Br. J. Cancer* **2008**, 98, 1881-1885, *Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words.*
- [112] G. R. Kafer, X. Li, T. Horii, I. Suetake, S. Tajima, I. Hatada, P. M. Carlton, *Cell Rep.* **2016**, 14, 1283-1292, *5-Hydroxymethylcytosine Marks Sites of DNA Damage and Promotes Genome Stability.*
- [113] M. Dejosez, S. S. Levine, G. M. Frampton, W. A. Whyte, S. A. Stratton, M. C. Barton, P. H. Gunaratne, R. A. Young, T. P. Zwaka, *Genes Dev.* **2010**, 24, 1479-1484, *Ronin/Hcf-1 binds to a hyperconserved enhancer element and regulates genes involved in the growth of embryonic stem cells.*
- [114] J. Michaud, V. Praz, N. James Faresse, C. K. JnBaptiste, S. Tyagi, F. Schütz, W. Herr, *Genome Res.* **2013**, 23, 907-916, *HCFC1 is a common component of active human CpG-island*

- promoters and coincides with ZNF143, THAP11, YY1, and GABP transcription factor occupancy.*
- [115] F. Uhlmann, J. Cai, H. Flores-Rozas, F. B. Dean, J. Finkelstein, M. O'Donnell, J. Hurwitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 6521-6526, *In vitro reconstitution of human replication factor C from its five subunits.*
 - [116] T. Pfaffeneder, F. Spada, M. Wagner, C. Brandmayr, S. K. Laube, D. Eisen, M. Truss, J. Steinbacher, B. Hackner, O. Kotljarova, D. Schuermann, S. Michalakis, O. Kosmatchev, S. Schiesser, B. Steigenberger, N. Raddaoui, G. Kashiwazaki, U. Müller, C. G. Spruijt, M. Vermeulen, H. Leonhardt, P. Schär, M. Müller, T. Carell, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 574-581, *Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA.*
 - [117] M. Wagner, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München **2016**, *Massenspektrometrie-basierte Untersuchungen nichtkanonischer DNA- und RNA-Nukleoside - Verteilung in Organen und Geweben, altersabhängige Dynamiken und Beteiligung an der aktiven DNA-Demethylierung.*
 - [118] T. Pfaffeneder, B. Hackner, M. Truss, M. Munzel, M. Müller, C. A. Deiml, C. Hagemeyer, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50, 7008-7012, *The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA.*
 - [119] E.-A. Raiber, D. Beraldi, G. Ficuz, H. E. Burgess, M. R. Branco, P. Murat, D. Oxley, M. J. Booth, W. Reik, S. Balasubramanian, *Genome Biol.* **2012**, 13, 1-11, *Genome-wide distribution of 5-formylcytosine in embryonic stem cells is associated with transcription and depends on thymine DNA glycosylase.*
 - [120] M. W. Kellinger, C.-X. Song, J. Chong, X.-Y. Lu, C. He, D. Wang, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, 19, 831-833, *5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine reduce the rate and substrate specificity of RNA polymerase II transcription.*
 - [121] L. Wang, Y. Zhou, L. Xu, R. Xiao, X. Lu, L. Chen, J. Chong, H. Li, C. He, X.-D. Fu, D. Wang, *Nature* **2015**, 523, 621-625, *Molecular basis for 5-carboxycytosine recognition by RNA polymerase II elongation complex.*
 - [122] A. Alioui, L. M. Wheldon, A. Abakir, Z. Ferjentsik, A. D. Johnson, A. Ruzov, *Nucleus* **2012**, 3, 565-569, *5-Carboxylcytosine is localized to euchromatic regions in the nuclei of follicular cells in axolotl ovary.*
 - [123] F. Neri, D. Incarnato, A. Krepelova, D. Dettori, S. Rapelli, M. Maldotti, C. Parlato, F. Anselmi, F. Galvagni, S. Oliviero, *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43, 6814-6826, *TET1 is controlled by pluripotency-associated factors in ESCs and downmodulated by PRC2 in differentiated cells and tissues.*
 - [124] L. Shen, H. Wu, D. Diep, S. Yamaguchi, A. C. D'Alessio, H. L. Fung, K. Zhang, Y. Zhang, *Cell* **2013**, 153, *Genome-wide analysis reveals TET- and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics.*
 - [125] A. Inoue, L. Shen, Q. Dai, C. He, Y. Zhang, *Cell Res.* **2011**, 21, 1670-1676, *Generation and replication-dependent dilution of 5fC and 5caC during mouse preimplantation development.*
 - [126] M. Iurlaro, G. R. McInroy, H. E. Burgess, W. Dean, E.-A. Raiber, M. Bachman, D. Beraldi, S. Balasubramanian, W. Reik, *Genome Biol.* **2016**, 17, 141, *In vivo genome-wide profiling reveals a tissue-specific role for 5-formylcytosine.*

- [127] C. Zhu, Y. Gao, H. Guo, B. Xia, J. Song, X. Wu, H. Zeng, K. Kee, F. Tang, C. Yi, *Cell Stem Cell* **2017**, 20, 720-731.e725, *Single-Cell 5-Formylcytosine Landscapes of Mammalian Early Embryos and ESCs at Single-Base Resolution*.
- [128] L. M. Wheldon, A. Abakir, Z. Ferjentsik, T. Dudnakova, S. Strohbuecker, D. Christie, N. Dai, S. Guan, J. M. Foster, I. R. Corrêa Jr, M. Loose, J. E. Dixon, V. Sottile, A. D. Johnson, A. Ruzov, *Cell Rep.* **2014**, 7, 1353-1361, *Transient Accumulation of 5-Carboxylcytosine Indicates Involvement of Active Demethylation in Lineage Specification of Neural Stem Cells*.
- [129] M. Bachman, S. Uribe-Lewis, X. Yang, H. E. Burgess, M. Iurlaro, W. Reik, A. Murrell, S. Balasubramanian, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11, 555-557, *5-Formylcytosine can be a stable DNA modification in mammals*.
- [130] M. Su, A. Kirchner, S. Stazzoni, M. Müller, M. Wagner, A. Schröder, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, 55, 11797-11800, *5-Formylcytosine Could Be a Semipermanent Base in Specific Genome Sites*.
- [131] P. Carlsson, M. Mahlapuu, *Dev. Biol.* **2002**, 250, 1-23, *Forkhead Transcription Factors: Key Players in Development and Metabolism*.
- [132] A. S. Lalmansingh, S. Karmakar, Y. Jin, A. K. Nagaich, *Biochim. Biophys. Acta, Gene Regul. Mech.* **2012**, 1819, 707-715, *Multiple modes of chromatin remodeling by Forkhead box proteins*.
- [133] M. J. Booth, G. Marsico, M. Bachman, D. Beraldi, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2014**, 6, 435-440, *Quantitative sequencing of 5-formylcytosine in DNA at single-base resolution*.
- [134] J. S. Hardwick, D. Ptchelkine, A. H. El-Sagheer, I. Tear, D. Singleton, S. E. V. Phillips, A. N. Lane, T. Brown, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *5-Formylcytosine does not change the global structure of DNA*.
- [135] E.-A. Raiber, P. Murat, D. Y. Chirgadze, D. Beraldi, B. F. Luisi, S. Balasubramanian, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, 22, 44-49, *5-Formylcytosine alters the structure of the DNA double helix*.
- [136] D. Wang, H. Hashimoto, X. Zhang, B. G. Barwick, S. Lonial, L. H. Boise, P. M. Vertino, X. Cheng, *Nucleic Acids Res.* **2016**, gkw1184, *MAX is an epigenetic sensor of 5-carboxylcytosine and is altered in multiple myeloma*.
- [137] J. J. Day, J. D. Sweatt, *Nat. Neurosci.* **2010**, 13, 1319-1323, *DNA methylation and memory formation*.
- [138] D. K. Ma, M.-H. Jang, J. U. Guo, Y. Kitabatake, M.-I. Chang, N. Pow-anpongkul, R. A. Flavell, B. Lu, G.-I. Ming, H. Song, *Science* **2009**, 323, 1074-1077, *Neuronal Activity-Induced Gadd45b Promotes Epigenetic DNA Demethylation and Adult Neurogenesis*.
- [139] D. K. Ma, M. C. Marchetto, J. U. Guo, G.-I. Ming, F. H. Gage, H. Song, *Nat. Neurosci.* **2010**, 13, 1338-1344, *Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain*.
- [140] K. Martinowich, D. Hattori, H. Wu, S. Fouse, F. He, Y. Hu, G. Fan, Y. E. Sun, *Science* **2003**, 302, 890-893, *DNA Methylation-Related Chromatin Remodeling in Activity-Dependent Bdnf Gene Regulation*.
- [141] C. A. Miller, J. D. Sweatt, *Neuron* **2007**, 53, 857-869, *Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation*.

- [142] J.-K. Zhu, *Annu. Rev. Genet.* **2009**, *43*, 143-166, *Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases*.
- [143] P. Hajkova, S. Erhardt, N. Lane, T. Haaf, O. El-Maarri, W. Reik, J. Walter, M. A. Surani, *Mech. Dev.* **2002**, *117*, 15-23, *Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells*.
- [144] P. Hajkova, S. J. Jeffries, C. Lee, N. Miller, S. P. Jackson, M. A. Surani, *Science* **2010**, *329*, 78-82, *Genome-Wide Reprogramming in the Mouse Germ Line Entails the Base Excision Repair Pathway*.
- [145] H. Sasaki, Y. Matsui, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 129-140, *Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond*.
- [146] B. Delatte, R. Deplus, F. Fuks, *EMBO J.* **2014**, *33*, 1198-1211, *Playing TETris with DNA modifications*.
- [147] P. W. S. Hill, R. Amouroux, P. Hajkova, *Genomics* **2014**, *104*, 324-333, *DNA demethylation, Tet proteins and 5-hydroxymethylcytosine in epigenetic reprogramming: An emerging complex story*.
- [148] R. M. Kohli, Y. Zhang, *Nature* **2013**, *502*, 472-479, *TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation*.
- [149] S. Kriaucionis, M. Tahiliani, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2014**, *6*, *Expanding the Epigenetic Landscape: Novel Modifications of Cytosine in Genomic DNA*.
- [150] H. J. Lee, T. A. Hore, W. Reik, *Cell Stem Cell* **2014**, *14*, 710-719, *Reprogramming the Methylome: Erasing Memory and Creating Diversity*.
- [151] W. A. Pastor, L. Aravind, A. Rao, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 341-356, *TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription*.
- [152] F. M. Piccolo, A. G. Fisher, *Trends Cell Biol.* **2014**, *24*, 136-143, *Getting rid of DNA methylation*.
- [153] L. Shen, Y. Zhang, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2013**, *25*, 289-296, *5-Hydroxymethylcytosine: generation, fate, and genomic distribution*.
- [154] C. Jin, T. Qin, M. C. Barton, J. Jelinek, J. P. Issa, *Epigenetics* **2015**, *10*, 1006-1013, *Minimal role of base excision repair in TET-induced global DNA demethylation in HEK293T cells*.
- [155] S. Kagiwada, K. Kurimoto, T. Hirota, M. Yamaji, M. Saitou, *EMBO J.* **2013**, *32*, 340-353, *Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice*.
- [156] G. L. Dianov, U. Hübscher, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 3483-3490, *Mammalian Base Excision Repair: the Forgotten Archangel*.
- [157] H. E. Krokan, M. Bjørås, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2013**, *5*, *Base Excision Repair*.
- [158] M. D. Wyatt, *Adv. Cancer Res.* **2013**, *119*, 63-106, *Advances in understanding the coupling of DNA base modifying enzymes to processes involving base excision repair*.
- [159] A. Inoue, Y. Zhang, *Science* **2011**, *334*, 194, *Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos*.

- [160] A. Inoue, L. Shen, Q. Dai, C. He, Y. Zhang, *Cell Res.* **2011**, *21*, 1670-1676, *Generation and replication-dependent dilution of 5fC and 5caC during mouse preimplantation development.*
- [161] H. Hashimoto, Y. Liu, A. K. Upadhyay, Y. Chang, S. B. Howerton, P. M. Vertino, X. Zhang, X. Cheng, *Nucleic Acids Res.* **2012**, gks155, *Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation.*
- [162] L. S. Pidugu, J. W. Flowers, C. T. Coey, E. Pozharski, M. M. Greenberg, A. C. Drohat, *Biochemistry* **2016**, *Structural Basis for Excision of 5-Formylcytosine by Thymine DNA Glycosylase.*
- [163] A. Maiti, A. C. Drohat, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, *Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: Potential implications for active demethylation of CpG sites.*
- [164] H. D. Morgan, W. Dean, H. A. Coker, W. Reik, S. K. Petersen-Mahrt, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 52353-52360, *Activation-induced Cytidine Deaminase Deaminates 5-Methylcytosine in DNA and Is Expressed in Pluripotent Tissues: IMPLICATIONS FOR EPIGENETIC REPROGRAMMING.*
- [165] S. Cortellino, J. Xu, M. Sannai, R. Moore, E. Caretti, A. Cigliano, M. Le Coz, K. Devarajan, A. Wessels, D. Soprano, Lara K. Abramowitz, Marisa S. Bartolomei, F. Rambow, Maria R. Bassi, T. Bruno, M. Fanciulli, C. Renner, Andres J. Klein-Szanto, Y. Matsumoto, D. Kobi, I. Davidson, C. Alberti, L. Larue, A. Bellacosa, *Cell* **2011**, *146*, 67-79, *Thymine DNA Glycosylase Is Essential for Active DNA Demethylation by Linked Deamination-Base Excision Repair.*
- [166] J. U. Guo, Y. Su, C. Zhong, G.-L. Ming, H. Song, *Cell* **2011**, *145*, 423-434, *Hydroxylation of 5-Methylcytosine by TET1 Promotes Active DNA Demethylation in the Adult Brain.*
- [167] S. Schiesser, B. Hackner, T. Pfaffeneder, M. Müller, C. Hagemeier, M. Truss, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 6516-6520, *Mechanism and Stem-Cell Activity of 5-Carboxycytosine Decarboxylation Determined by Isotope Tracing.*
- [168] S. Schiesser, T. Pfaffeneder, K. Sadeghian, B. Hackner, B. Steigenberger, A. S. Schröder, J. Steinbacher, G. Kashiwazaki, G. Höfner, K. T. Wanner, C. Ochsenfeld, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14593-14599, *Deamination, Oxidation, and C–C Bond Cleavage Reactivity of 5-Hydroxymethylcytosine, 5-Formylcytosine, and 5-Carboxycytosine.*
- [169] J. Cadet, J. R. Wagner, *Mutat. Res.* **2014**, *764–765*, 18-35, *TET enzymatic oxidation of 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine.*
- [170] L. M. Iyer, M. Tahiliani, A. Rao, L. Aravind, *Cell Cycle* **2009**, *8*, 1698-1710, *Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids.*
- [171] H. Zhao, T. Chen, *J. Hum. Genet.* **2013**, *58*, 421-427, *Tet family of 5-methylcytosine dioxygenases in mammalian development.*
- [172] I. Cantone, A. G. Fisher, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 282-289, *Epigenetic programming and reprogramming during development.*
- [173] X. Lu, B. S. Zhao, C. He, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2225-2239, *TET Family Proteins: Oxidation Activity, Interacting Molecules, and Functions in Diseases.*

- [174] L. Liu, S.-Q. Mao, C. Ray, Y. Zhang, F. T. Bell, S.-F. Ng, G.-L. Xu, X. Li, *Stem Cell Res.* **2015**, *15*, 435-443, *Differential regulation of genomic imprinting by TET proteins in embryonic stem cells.*
- [175] F. P. Guengerich, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 20700-20701, *Introduction: Metals in Biology: α -Ketoglutarate/Iron-Dependent Dioxygenases.*
- [176] R. B. Lorschach, J. Moore, S. Mathew, S. C. Raimondi, S. T. Mukatira, J. R. Downing, *Leukemia* **2003**, *17*, 637-641, *TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23).*
- [177] R. Ono, T. Taki, T. Taketani, M. Taniwaki, H. Kobayashi, Y. Hayashi, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4075-4080, *LCX, Leukemia-associated Protein with a CXXC Domain, Is Fused to MLL in Acute Myeloid Leukemia with Trilineage Dysplasia Having t(10;11)(q22;q23).*
- [178] L. M. Iyer, S. Abhiman, L. Aravind, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2011**, *101*, 25-104, *Natural history of eukaryotic DNA methylation systems.*
- [179] L. Tan, Y. G. Shi, *Development* **2012**, *139*, 1895-1902, *Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease.*
- [180] S. Ito, A. C. D'Alessio, O. V. Taranova, K. Hong, L. C. Sowers, Y. Zhang, *Nature* **2010**, *466*, 1129-1133, *Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification.*
- [181] J. Ahinger, *Trends Genet.* **2000**, *16*, 351-356, *NuRD and SIN3: histone deacetylase complexes in development.*
- [182] A. Grzenda, G. Lomberg, J.-S. Zhang, R. Urrutia, *Biochim. Biophys. Acta, Gene Regul. Mech.* **2009**, *1789*, 443-450, *Sin3: Master scaffold and transcriptional corepressor.*
- [183] P. Koivisto, T. Duncan, T. Lindahl, B. Sedgwick, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44348-44354, *Minimal Methylated Substrate and Extended Substrate Range of Escherichia coli AlkB Protein, a 1-Methyladenine-DNA Dioxygenase.*
- [184] R. D. Palmatier, R. P. McCroskey, M. T. Abbott, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 6706-6710, *The Enzymatic Conversion of Uracil 5-Carboxylic Acid to Uracil and Carbon Dioxide.*
- [185] N. R. Rose, M. A. McDonough, O. N. King, A. Kawamura, C. J. Schofield, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4364-4397, *Inhibition of 2-oxoglutarate dependent oxygenases.*
- [186] T. W. Roy, A. S. Bhagwat, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e147, *Kinetic studies of Escherichia coli AlkB using a new fluorescence-based assay for DNA demethylation.*
- [187] R. A. Silverstein, K. Ekwall, *Curr. Genet.* **2005**, *47*, 1-17, *Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability.*
- [188] H. Wu, Y. Zhang, *Cell Cycle* **2011**, *10*, 2428-2436, *Tet1 and 5-hydroxymethylation.*
- [189] O. Yildirim, R. Li, J.-H. Hung, Poshen B. Chen, X. Dong, L.-S. Ee, Z. Weng, Oliver J. Rando, Thomas G. Fazio, *Cell* **2011**, *147*, 1498-1510, *Mbd3/NURD Complex Regulates Expression of 5-Hydroxymethylcytosine Marked Genes in Embryonic Stem Cells.*
- [190] B. Yu, W. C. Edstrom, J. Benach, Y. Hamuro, P. C. Weber, B. R. Gibney, J. F. Hunt, *Nature* **2006**, *439*, 879-884, *Crystal structures of catalytic complexes of the oxidative DNA/RNA repair enzyme AlkB.*

- [191] E. Tamanaha, S. Guan, K. Marks, L. Saleh, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9345-9348, *Distributive Processing by the Iron (II)/ α -Ketoglutarate-Dependent Catalytic Domains of the TET Enzymes Is Consistent with Epigenetic Roles for Oxidized 5-Methylcytosine Bases.*
- [192] J. Xiong, Z. Zhang, J. Chen, H. Huang, Y. Xu, X. Ding, Y. Zheng, R. Nishinakamura, G.-L. Xu, H. Wang, S. Chen, S. Gao, B. Zhu, *Mol. Cell* **2016**, *64*, 913-925, *Cooperative Action between SALL4A and TET Proteins in Stepwise Oxidation of 5-Methylcytosine.*
- [193] D. J. Crawford, M. Y. Liu, C. S. Nabel, X. J. Cao, B. A. Garcia, R. M. Kohli, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 730-733, *Tet2 Catalyzes Stepwise 5-Methylcytosine Oxidation by an Iterative and de novo Mechanism.*
- [194] L. Hu, J. Lu, J. Cheng, Q. Rao, Z. Li, H. Hou, Z. Lou, L. Zhang, W. Li, W. Gong, M. Liu, C. Sun, X. Yin, J. Li, X. Tan, P. Wang, Y. Wang, D. Fang, Q. Cui, P. Yang, C. He, H. Jiang, C. Luo, Y. Xu, *Nature* **2015**, *527*, 118-122, *Structural insight into substrate preference for TET-mediated oxidation.*
- [195] M. Y. Liu, H. Torabifard, D. J. Crawford, J. E. DeNizio, X. J. Cao, B. A. Garcia, G. A. Cisneros, R. M. Kohli, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 181-187, *Mutations along a TET2 active site scaffold stall oxidation at 5-hydroxymethylcytosine.*
- [196] R. Fujiki, W. Hashiba, H. Sekine, A. Yokoyama, T. Chikanishi, S. Ito, Y. Imai, J. Kim, H. H. He, K. Igarashi, J. Kanno, F. Ohtake, H. Kitagawa, R. G. Roeder, M. Brown, S. Kato, *Nature* **2011**, *480*, 557-560, *GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination.*
- [197] T.-P. Gu, F. Guo, H. Yang, H.-P. Wu, G.-F. Xu, W. Liu, Z.-G. Xie, L. Shi, X. He, S.-g. Jin, K. Iqbal, Y. G. Shi, Z. Deng, P. E. Szabo, G. P. Pfeifer, J. Li, G.-L. Xu, *Nature* **2011**, *477*, 606-610, *The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes.*
- [198] C. Li, Y. Lan, L. Schwartz-Orbach, E. Korol, M. Tahiliani, T. Evans, Mary G. Goll, *Cell Rep.* **2015**, *12*, 1133-1143, *Overlapping Requirements for Tet2 and Tet3 in Normal Development and Hematopoietic Stem Cell Emergence.*
- [199] Z. D. Smith, M. M. Chan, T. S. Mikkelsen, H. Gu, A. Gnirke, A. Regev, A. Meissner, *Nature* **2012**, *484*, 339-344, *A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo.*
- [200] H. Hashimoto, J. E. Pais, N. Dai, I. R. Corrêa, X. Zhang, Y. Zheng, X. Cheng, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *Structure of Naegleria Tet-like dioxygenase (NgTet1) in complexes with a reaction intermediate 5-hydroxymethylcytosine DNA.*
- [201] H. Hashimoto, J. E. Pais, X. Zhang, L. Saleh, Z.-Q. Fu, N. Dai, I. R. Correa, Y. Zheng, X. Cheng, *Nature* **2014**, *506*, 391-395, *Structure of a Naegleria Tet-like dioxygenase in complex with 5-methylcytosine DNA.*
- [202] H. Hashimoto, X. Zhang, P. M. Vertino, X. Cheng, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 20723-20733, *The Mechanisms of Generation, Recognition, and Erasure of DNA 5-Methylcytosine and Thymine Oxidations.*
- [203] L. Hu, Z. Li, J. Cheng, Q. Rao, W. Gong, M. Liu, Y. G. Shi, J. Zhu, P. Wang, Y. Xu, *Cell* **2013**, *155*, 1545-1555, *Crystal Structure of TET2-DNA Complex: Insight into TET-Mediated 5mC Oxidation.*

- [204] L. Fu, C. R. Guerrero, N. Zhong, N. J. Amato, Y. Liu, S. Liu, Q. Cai, D. Ji, S. G. Jin, L. J. Niedernhofer, G. P. Pfeifer, G. L. Xu, Y. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11582-11585, *Tet-mediated formation of 5-hydroxymethylcytosine in RNA*.
- [205] A. K. Upadhyay, J. R. Horton, X. Zhang, X. Cheng, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 750-760, *Coordinated methyl-lysine erasure: structural and functional linkage of a Jumonji demethylase domain and a reader domain*.
- [206] H K. Long, N P. Blackledge, R J. Klose, *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41*, 727-740, *ZF-CxxC domain-containing proteins, CpG islands and the chromatin connection*.
- [207] M. Ko, J. An, H. S. Bandukwala, L. Chavez, T. Aijo, W. A. Pastor, M. F. Segal, H. Li, K. P. Koh, H. Lahdesmaki, P. G. Hogan, L. Aravind, A. Rao, *Nature* **2013**, *497*, 122-126, *Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX*.
- [208] N. Liu, M. Wang, W. Deng, C. S. Schmidt, W. Qin, H. Leonhardt, F. Spada, *PLoS One* **2013**, *8*, e62755, *Intrinsic and Extrinsic Connections of Tet3 Dioxygenase with CXXC Zinc Finger Modules*.
- [209] Y. Fu, C. He, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 516-524, *Nucleic acid modifications with epigenetic significance*.
- [210] H. Wu, A. C. D'Alessio, S. Ito, K. Xia, Z. Wang, K. Cui, K. Zhao, Y. Eve Sun, Y. Zhang, *Nature* **2011**, *473*, 389-393, *Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells*.
- [211] Y. Xu, C. Xu, A. Kato, W. Tempel, Jose G. Abreu, C. Bian, Y. Hu, D. Hu, B. Zhao, T. Cerovina, J. Diao, F. Wu, Housheng H. He, Q. Cui, E. Clark, C. Ma, A. Barbara, Gert Jan C. Veenstra, G. Xu, Ursula B. Kaiser, X. S. Liu, Stephen P. Sugrue, X. He, J. Min, Y. Kato, Yujiang G. Shi, *Cell* **2012**, *151*, 1200-1213, *Tet3 CXXC Domain and Dioxygenase Activity Cooperatively Regulate Key Genes for Xenopus Eye and Neural Development*.
- [212] Y. Xu, F. Wu, L. Tan, L. Kong, L. Xiong, J. Deng, A. J. Barbera, L. Zheng, H. Zhang, S. Huang, J. Min, T. Nicholson, T. Chen, G. Xu, Y. Shi, K. Zhang, Yujiang G. Shi, *Mol. Cell* **2011**, *42*, 451-464, *Genome-wide Regulation of 5hmC, 5mC, and Gene Expression by Tet1 Hydroxylase in Mouse Embryonic Stem Cells*.
- [213] H. Zhang, X. Zhang, E. Clark, M. Mulcahey, S. Huang, Y. G. Shi, *Cell Res.* **2010**, *20*, 1390-1393, *TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine*.
- [214] Q. Chen, Y. Chen, C. Bian, R. Fujiki, X. Yu, *Nature* **2013**, *493*, 561-564, *TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription*.
- [215] R. Kadamb, S. Mittal, N. Bansal, H. Batra, D. Saluja, *Eur. J. Cell Biol.* **2013**, *92*, 237-246, *Sin3: insight into its transcription regulatory functions*.
- [216] F. T. Shi, H. Kim, W. Lu, Q. He, D. Liu, M. A. Goodell, M. Wan, Z. Songyang, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 20776-20784, *Ten-eleven translocation 1 (Tet1) is regulated by O-linked N-acetylglucosamine transferase (Ogt) for target gene repression in mouse embryonic stem cells*.
- [217] M. M. Dawlaty, K. Ganz, B. E. Powell, Y.-C. Hu, S. Markoulaki, A. W. Cheng, Q. Gao, J. Kim, S.-W. Choi, D. C. Page, R. Jaenisch, *Cell Stem Cell* **2011**, *9*, 166-175, *Tet1 Is Dispensable for*

- Maintaining Pluripotency and Its Loss Is Compatible with Embryonic and Postnatal Development.*
- [218] R. R. Zhang, Q. Y. Cui, K. Murai, Y. C. Lim, Z. D. Smith, S. Jin, P. Ye, L. Rosa, Y. K. Lee, H. P. Wu, W. Liu, Z. M. Xu, L. Yang, Y. Q. Ding, F. Tang, A. Meissner, C. Ding, Y. Shi, G. L. Xu, *Cell Stem Cell* **2013**, *13*, 237-245, *Tet1 regulates adult hippocampal neurogenesis and cognition.*
 - [219] A. Rudenko, Meelad M. Dawlaty, J. Seo, Albert W. Cheng, J. Meng, T. Le, Kym F. Faull, R. Jaenisch, L.-H. Tsai, *Neuron* **2013**, *79*, 1109-1122, *Tet1 Is Critical for Neuronal Activity-Regulated Gene Expression and Memory Extinction.*
 - [220] T. Kato, K. Iwamoto, *Neuropharmacology* **2014**, *80*, 133-139, *Comprehensive DNA methylation and hydroxymethylation analysis in the human brain and its implication in mental disorders.*
 - [221] M. Santiago, C. Antunes, M. Guedes, N. Sousa, C. J. Marques, *Genomics* **2014**, *104*, 334-340, *TET enzymes and DNA hydroxymethylation in neural development and function - how critical are they?*
 - [222] J. Shin, G. L. Ming, H. Song, *Philos. Trans. R. Soc., B* **2014**, *369*, *DNA modifications in the mammalian brain.*
 - [223] W. Sun, L. Zang, Q. Shu, X. Li, *Genomics* **2014**, *104*, 347-351, *From development to diseases: the role of 5hmC in brain.*
 - [224] L. Wen, F. Tang, *Genomics* **2014**, *104*, 341-346, *Genomic distribution and possible functions of DNA hydroxymethylation in the brain.*
 - [225] I. B. Zovkic, M. C. Guzman-Karlsson, J. D. Sweatt, *Learn. Mem.* **2013**, *20*, 61-74, *Epigenetic regulation of memory formation and maintenance.*
 - [226] K. P. Koh, A. Yabuuchi, S. Rao, Y. Huang, K. Cunliffe, J. Nardone, A. Laiho, M. Tahiliani, C. A. Sommer, G. Mostoslavsky, R. Lahesmaa, S. H. Orkin, S. J. Rodig, G. Q. Daley, A. Rao, *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 200-213, *Tet1 and Tet2 Regulate 5-Hydroxymethylcytosine Production and Cell Lineage Specification in Mouse Embryonic Stem Cells.*
 - [227] S. Yamaguchi, L. Shen, Y. Liu, D. Sendler, Y. Zhang, *Nature* **2013**, *504*, 460-464, *Role of Tet1 in erasure of genomic imprinting.*
 - [228] W. Zhang, W. Xia, Q. Wang, A. J. Towers, J. Chen, R. Gao, Y. Zhang, C.-a. Yen, A. Y. Lee, Y. Li, C. Zhou, K. Liu, J. Zhang, T.-P. Gu, X. Chen, Z. Chang, D. Leung, S. Gao, Y.-h. Jiang, W. Xie, *Mol. Cell* **2016**, *64*, 1062-1073, *Isoform Switch of TET1 Regulates DNA Demethylation and Mouse Development.*
 - [229] Y. Costa, J. Ding, T. W. Theunissen, F. Faiola, T. A. Hore, P. V. Shliaha, M. Fidalgo, A. Saunders, M. Lawrence, S. Dietmann, S. Das, D. N. Levasseur, Z. Li, M. Xu, W. Reik, J. C. Silva, J. Wang, *Nature* **2013**, *495*, 370-374, *NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency.*
 - [230] A. Gagliardi, N. P. Mullin, Z. Ying Tan, D. Colby, A. I. Kousa, F. Halbritter, J. T. Weiss, A. Felker, K. Bezstarosti, R. Favaro, J. Demmers, S. K. Nicolis, S. R. Tomlinson, R. A. Poot, I. Chambers, *EMBO J.* **2013**, *32*, 2231-2247, *A direct physical interaction between Nanog and Sox2 regulates embryonic stem cell self-renewal.*

- [231] H. Wu, Y. Zhang, *Genes Dev.* **2011**, *25*, 2436-2452, *Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation.*
- [232] R. Deplus, B. Delatte, M. K. Schwinn, M. Defrance, J. Mendez, N. Murphy, M. A. Dawson, M. Volkmar, P. Putmans, E. Calonne, A. H. Shih, R. L. Levine, O. Bernard, T. Mercher, E. Solary, M. Urh, D. L. Daniels, F. Fuks, *EMBO J.* **2013**, *32*, 645-655, *TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS.*
- [233] K. Williams, J. Christensen, K. Helin, *EMBO Rep.* **2012**, *13*, 28-35, *DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands?*
- [234] K. Meier, A. Brehm, *Epigenetics* **2014**, *9*, 1485-1495, *Chromatin regulation: how complex does it get?*
- [235] J. Ramirez, J. Hagman, *Epigenetics* **2009**, *4*, 532-536, *The Mi-2/NuRD complex: a critical epigenetic regulator of hematopoietic development, differentiation and cancer.*
- [236] M. P. Torchy, A. Hamiche, B. P. Klaholz, *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 2491-2507, *Structure and function insights into the NuRD chromatin remodeling complex.*
- [237] A. K. Ludwig, P. Zhang, F. D. Hastert, S. Meyer, C. Rausch, H. D. Herce, U. Muller, A. Lehmkuhl, I. Hellmann, C. Trummer, C. Storm, H. Leonhardt, M. C. Cardoso, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *Binding of MBD proteins to DNA blocks Tet1 function thereby modulating transcriptional noise.*
- [238] P. Vella, A. Scelfo, S. Jammula, F. Chiacchiera, K. Williams, A. Cuomo, A. Roberto, J. Christensen, T. Bonaldi, K. Helin, D. Pasini, *Mol. Cell* **2013**, *49*, 645-656, *Tet proteins connect the O-linked N-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells.*
- [239] X. Shen, Y. Liu, Y. J. Hsu, Y. Fujiwara, J. Kim, X. Mao, G. C. Yuan, S. H. Orkin, *Mol. Cell* **2008**, *32*, 491-502, *EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency.*
- [240] P. F. Cartron, A. Nadaradjane, F. Lepape, L. Lalier, B. Gardie, F. M. Vallette, *Genes Cancer* **2013**, *4*, 235-241, *Identification of TET1 Partners That Control Its DNA-Demethylating Function.*
- [241] K. Williams, J. Christensen, K. Helin, *EMBO Rep.* **2011**, *13*, 28-35, *DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands?*
- [242] B. Delatte, R. Deplus, F. Fuks, *EMBO J.* **2014**, *33*, 1198-1211, *Playing TETris with DNA modifications.*
- [243] L. Zheng, Y. Zhai, N. Li, F. Ma, H. Zhu, X. Du, G. Li, J. Hua, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, *The Modification of Tet1 in Male Germline Stem Cells and Interact with PCNA, HDAC1 to promote their Self-renewal and Proliferation.*
- [244] S. M. Langemeijer, R. P. Kuiper, M. Berends, R. Knops, M. G. Aslanyan, M. Massop, E. Stevens-Linders, P. van Hoogen, A. G. van Kessel, R. A. Raymakers, E. J. Kamping, G. E. Verhoef, E. Verburch, A. Hagemeijer, P. Vandenbergh, T. de Witte, B. A. van der Reijden, J. H. Jansen, *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 838-842, *Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes.*
- [245] F. Mohr, K. Dohner, C. Buske, V. P. Rawat, *Exp. Hematol.* **2011**, *39*, 272-281, *TET genes: new players in DNA demethylation and important determinants for stemness.*

- [246] C. He, S. Sidoli, R. Warneford-Thomson, Deirdre C. Tatomer, Jeremy E. Wilusz, Benjamin A. Garcia, R. Bonasio, *Mol. Cell* **2016**, *64*, 416-430, *High-Resolution Mapping of RNA-Binding Regions in the Nuclear Proteome of Embryonic Stem Cells*.
- [247] M. Basanta-Sanchez, R. Wang, Z. Liu, X. Ye, M. Li, X. Shi, P. Agris, Y. Zhou, Y. Huang, J. Sheng, *ChemBioChem* **2016**, *TET1-mediated Oxidation of 5-formylcytosine (5fC) to 5-carboxycytosine (5caC) in RNA*.
- [248] S. G. Jin, Z. M. Zhang, T. L. Dunwell, M. R. Harter, X. Wu, J. Johnson, Z. Li, J. Liu, P. E. Szabo, Q. Lu, G. L. Xu, J. Song, G. P. Pfeifer, *Cell Rep.* **2016**, *14*, 493-505, *Tet3 Reads 5-Carboxylcytosine through Its CXXC Domain and Is a Potential Guardian against Neurodegeneration*.
- [249] Y. Xu, C. Xu, A. Kato, W. Tempel, J. G. Abreu, C. Bian, Y. Hu, D. Hu, B. Zhao, T. Cerovina, J. Diao, F. Wu, H. H. He, Q. Cui, E. Clark, C. Ma, A. Barbara, G. J. Veenstra, G. Xu, U. B. Kaiser, X. S. Liu, S. P. Sugrue, X. He, J. Min, Y. Kato, Y. G. Shi, *Cell* **2012**, *151*, 1200-1213, *Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for Xenopus eye and neural development*.
- [250] Z. Li, X. Cai, C. L. Cai, J. Wang, W. Zhang, B. E. Petersen, F. C. Yang, M. Xu, *Blood* **2011**, *118*, 4509-4518, *Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies*.
- [251] M. M. Dawlaty, A. Breiling, T. Le, G. Raddatz, M. I. Barrasa, A. W. Cheng, Q. Gao, B. E. Powell, Z. Li, M. Xu, K. F. Faull, F. Lyko, R. Jaenisch, *Dev. Cell* **2013**, *24*, 310-323, *Combined Deficiency of Tet1 and Tet2 Causes Epigenetic Abnormalities but Is Compatible with Postnatal Development*.
- [252] O. Abdel-Wahab, A. Mullally, C. Hedvat, G. Garcia-Manero, J. Patel, M. Wadleigh, S. Malinge, J. Yao, O. Kilpivaara, R. Bhat, K. Huberman, S. Thomas, I. Dolgalev, A. Heguy, E. Paietta, M. M. Le Beau, M. Beran, M. S. Tallman, B. L. Ebert, H. M. Kantarjian, R. M. Stone, D. G. Gilliland, J. D. Crispino, R. L. Levine, *Blood* **2009**, *114*, 144-147, *Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies*.
- [253] F. Albano, L. Anelli, A. Zagaria, N. Coccaro, A. Minervini, A. R. Rossi, G. Specchia, *Leuk. Res.* **2011**, *35*, e220-222, *Decreased TET2 gene expression during chronic myeloid leukemia progression*.
- [254] W.-C. Chou, S.-C. Chou, C.-Y. Liu, C.-Y. Chen, H.-A. Hou, Y.-Y. Kuo, M.-C. Lee, B.-S. Ko, J.-L. Tang, M. Yao, W. Tsay, S.-J. Wu, S.-Y. Huang, S.-C. Hsu, Y.-C. Chen, Y.-C. Chang, Y.-Y. Kuo, K.-T. Kuo, F.-Y. Lee, M.-C. Liu, C.-W. Liu, M.-H. Tseng, C.-F. Huang, H.-F. Tien, *Blood* **2011**, *118*, 3803-3810, *TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics*.
- [255] L. Cimmino, O. Abdel-Wahab, R. L. Levine, I. Aifantis, *Cell Stem Cell* **2011**, *9*, 193-204, *TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation*.
- [256] B. Euba, J. L. Vizmanos, M. García-Granero, P. Aranaz, C. Hurtado, I. Migueliz, F. J. Novo, M. García-Delgado, *Leuk. Lymphoma* **2012**, *53*, 1230-1233, *A meta-analysis of TET2 mutations shows a distinct distribution pattern in de novo acute myeloid leukemia and chronic myelomonocytic leukemia*.
- [257] A. Tefferi, K. H. Lim, O. Abdel-Wahab, T. L. Lasho, J. Patel, M. M. Patnaik, C. A. Hanson, A. Pardanani, D. G. Gilliland, R. L. Levine, *Leukemia* **2009**, *23*, 1343-1345, *Detection of mutant*

- TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML.*
- [258] S. Weissmann, T. Alpermann, V. Grossmann, A. Kowarsch, N. Nadarajah, C. Eder, F. Dicker, A. Fasan, C. Haferlach, T. Haferlach, W. Kern, S. Schnittger, A. Kohlmann, *Leukemia* **2012**, 26, 934-942, *Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia.*
 - [259] J. J. Fuster, S. MacLauchlan, M. A. Zuriaga, M. N. Polackal, A. C. Ostriker, R. Chakraborty, C. L. Wu, S. Sano, S. Muralidharan, C. Rius, J. Vuong, S. Jacob, V. Muralidhar, A. A. Robertson, M. A. Cooper, V. Andres, K. K. Hirschi, K. A. Martin, K. Walsh, *Science* **2017**, *Clonal hematopoiesis associated with Tet2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice.*
 - [260] Y. Wang, M. Xiao, X. Chen, L. Chen, Y. Xu, L. Lv, P. Wang, H. Yang, S. Ma, H. Lin, B. Jiao, R. Ren, D. Ye, K. L. Guan, Y. Xiong, *Mol. Cell* **2015**, 57, 662-673, *WT1 recruits TET2 to regulate its target gene expression and suppress leukemia cell proliferation.*
 - [261] L. de la Rica, J. Rodriguez-Ubrea, M. Garcia, A. B. Islam, J. M. Urquiza, H. Hernando, J. Christensen, K. Helin, C. Gomez-Vaquero, E. Ballestar, *Genome Biol.* **2013**, 14, R99, *PU.1 target genes undergo Tet2-coupled demethylation and DNMT3b-mediated methylation in monocyte-to-osteoclast differentiation.*
 - [262] Y. W. Zhang, Z. Wang, W. Xie, Y. Cai, L. Xia, H. Easwaran, J. Luo, R. C. Yen, Y. Li, S. B. Baylin, *Mol. Cell* **2017**, 65, 323-335, *Acetylation Enhances TET2 Function in Protecting against Abnormal DNA Methylation during Oxidative Stress.*
 - [263] A. Szwagierczak, S. Bultmann, C. S. Schmidt, F. Spada, H. Leonhardt, *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, e181, *Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA.*
 - [264] T. Li, D. Yang, J. Li, Y. Tang, J. Yang, W. Le, *Mol. Neurobiol.* **2015**, 51, 142-154, *Critical role of Tet3 in neural progenitor cell maintenance and terminal differentiation.*
 - [265] A. Perera, D. Eisen, M. Wagner, S. K. Laube, A. F. Kunzel, S. Koch, J. Steinbacher, E. Schulze, V. Splith, N. Mittermeier, M. Muller, M. Biel, T. Carell, S. Michalakis, *Cell Rep.* **2015**, 11, 283-294, *TET3 is recruited by REST for context-specific hydroxymethylation and induction of gene expression.*
 - [266] M. Kim, Y.-K. Park, T.-W. Kang, S.-H. Lee, Y.-H. Rhee, J.-L. Park, H.-J. Kim, D. Lee, D. Lee, S.-Y. Kim, *Hum. Mol. Genet.* **2014**, 23, 657-667, *Dynamic changes in DNA methylation and hydroxymethylation when hES cells undergo differentiation toward a neuronal lineage.*
 - [267] A. Szwagierczak, S. Bultmann, C. S. Schmidt, F. Spada, H. Leonhardt, *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, *Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA.*
 - [268] X. Lu, B. S. Zhao, C. He, *Chem. Rev.* **2015**, 115, 2225-2239, *TET family proteins: oxidation activity, interacting molecules, and functions in diseases.*
 - [269] F. Guo, X. Li, D. Liang, T. Li, P. Zhu, H. Guo, X. Wu, L. Wen, T. P. Gu, B. Hu, C. P. Walsh, J. Li, F. Tang, G. L. Xu, *Cell Stem Cell* **2014**, 15, 447-458, *Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote.*
 - [270] M. Wossidlo, T. Nakamura, K. Lepikhov, C. J. Marques, V. Zakhartchenko, M. Boiani, J. Arand, T. Nakano, W. Reik, J. Walter, *Nat. Commun.* **2011**, 2, 241, *5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming.*

- [271] X. S. Ma, X. G. Wang, L. Qin, C. L. Song, F. Lin, J. M. Song, C. C. Zhu, H. L. Liu, *GMR, Genet. Mol. Res.* **2014**, *13*, 8632-8639, *De novo DNA methylation of the paternal genome in 2-cell mouse embryos.*
- [272] S. Gkountela, K. X. Zhang, T. A. Shafiq, W. W. Liao, J. Hargan-Calvopina, P. Y. Chen, A. T. Clark, *Cell* **2015**, *161*, 1425-1436, *DNA Demethylation Dynamics in the Human Prenatal Germline.*
- [273] S. Guibert, T. Forne, M. Weber, *Genome Res.* **2012**, *22*, 633-641, *Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells.*
- [274] H. G. Leitch, W. W. Tang, M. A. Surani, *Curr. Top. Dev. Biol.* **2013**, *104*, 149-187, *Primordial germ-cell development and epigenetic reprogramming in mammals.*
- [275] S. Seisenberger, S. Andrews, F. Krueger, J. Arand, J. Walter, F. Santos, C. Popp, B. Thienpont, W. Dean, W. Reik, *Mol. Cell* **2012**, *48*, 849-862, *The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells.*
- [276] Y. Wang, Y. Zhang, *Cell Rep.* **2014**, *6*, 278-284, *Regulation of TET protein stability by calpains.*
- [277] M. M. Dawlaty, A. Breiling, T. Le, M. I. Barrasa, G. Raddatz, Q. Gao, B. E. Powell, A. W. Cheng, K. F. Faull, F. Lyko, R. Jaenisch, *Dev. Cell* **2014**, *29*, 102-111, *Loss of Tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells.*
- [278] H.-Q. Dai, B.-A. Wang, L. Yang, J.-J. Chen, G.-C. Zhu, M.-L. Sun, H. Ge, R. Wang, D. L. Chapman, F. Tang, X. Sun, G.-L. Xu, *Nature* **2016**, *advance online publication*, *TET-mediated DNA demethylation controls gastrulation by regulating Lefty–Nodal signalling.*
- [279] X. Li, X. Yue, W. A. Pastor, L. Lin, R. Georges, L. Chavez, S. M. Evans, A. Rao, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E8267-E8276, *Tet proteins influence the balance between neuroectodermal and mesodermal fate choice by inhibiting Wnt signaling.*
- [280] N. W. Penn, *Biochem. J.* **1976**, *155*, 709-712, *Modification of brain deoxyribonucleic acid base content with maturation in normal and malnourished rats.*
- [281] S. Benonisdottir, A. Oddsson, A. Helgason, R. P. Kristjansson, G. Sveinbjornsson, A. Oskarsdottir, G. Thorleifsson, O. B. Davidsson, G. A. Arnadottir, G. Sulem, B. O. Jensson, H. Holm, K. F. Alexandersson, L. Tryggvadottir, G. B. Walters, S. A. Gudjonsson, L. D. Ward, J. K. Sigurdsson, P. D. Iordache, M. L. Frigge, T. Rafnar, A. Kong, G. Masson, H. Helgason, U. Thorsteinsdottir, D. F. Gudbjartsson, P. Sulem, K. Stefansson, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13490, *Epigenetic and genetic components of height regulation.*
- [282] S. B. Baylin, P. A. Jones, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 726-734, *A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications.*
- [283] Y. Bergman, H. Cedar, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 274-281, *DNA methylation dynamics in health and disease.*
- [284] M. Esteller, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 286-298, *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps.*
- [285] S. E. Goelz, B. Vogelstein, S. R. Hamilton, A. P. Feinberg, *Science* **1985**, *228*, 187-190, *Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms.*
- [286] M. Kulis, M. Esteller, *Adv. Genet.* **2010**, *70*, 27-56, *DNA methylation and cancer.*
- [287] C. Lengauer, *Science* **2003**, *300*, 442-443, *Cancer. An unstable liaison.*

- [288] H. Shen, P. W. Laird, *Cell* **2013**, 153, 38-55, *Interplay between the cancer genome and epigenome*.
- [289] J. S. You, P. A. Jones, *Cancer Cell* **2012**, 22, 9-20, *Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?*
- [290] G. Egger, G. Liang, A. Aparicio, P. A. Jones, *Nature* **2004**, 429, 457-463, *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*.
- [291] A. Portela, M. Esteller, *Nat. Biotechnol.* **2010**, 28, 1057-1068, *Epigenetic modifications and human disease*.
- [292] T. K. Kelly, D. D. De Carvalho, P. A. Jones, *Nat. Biotechnol.* **2010**, 28, 1069-1078, *Epigenetic modifications as therapeutic targets*.
- [293] A. Eden, F. Gaudet, A. Waghmare, R. Jaenisch, *Science* **2003**, 300, 455, *Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation*.
- [294] F. Gaudet, J. G. Hodgson, A. Eden, L. Jackson-Grusby, J. Dausman, J. W. Gray, H. Leonhardt, R. Jaenisch, *Science* **2003**, 300, 489-492, *Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation*.
- [295] G. Ficiz, J. G. Gribben, *Genomics* **2014**, 104, 352-357, *Loss of 5-hydroxymethylcytosine in cancer: cause or consequence?*
- [296] L. I. Kroeze, B. A. van der Reijden, J. H. Jansen, *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, 1855, 144-154, *5-Hydroxymethylcytosine: An epigenetic mark frequently deregulated in cancer*.
- [297] G. P. Pfeifer, W. Xiong, M. A. Hahn, S. G. Jin, *Cell Tissue Res.* **2014**, 356, 631-641, *The role of 5-hydroxymethylcytosine in human cancer*.
- [298] L. Scourzic, E. Mouly, O. A. Bernard, *Genome Med.* **2015**, 7, 9, *TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer*.
- [299] A. Vasanthakumar, L. A. Godley, *Cancer Genet.* **2015**, 208, 167-177, *5-hydroxymethylcytosine in cancer: significance in diagnosis and therapy*.
- [300] Y. C. Wu, Z. Q. Ling, *Histol. Histopathol.* **2014**, 29, 991-997, *The role of TET family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in human tumors*.
- [301] C. Ye, L. Li, *Cancer Biol. Ther.* **2014**, 15, 10-15, *5-hydroxymethylcytosine: a new insight into epigenetics in cancer*.
- [302] B. Thienpont, J. Steinbacher, H. Zhao, F. D'Anna, A. Kuchnio, A. Ploumakis, B. Ghesquière, L. Van Dyck, B. Boeckx, L. Schoonjans, E. Hermans, F. Amant, V. N. Kristensen, K. P. Koh, M. Mazzone, M. L. Coleman, T. Carell, P. Carmeliet, D. Lambrechts, *Nature* **2016**, 537, 63-68, *Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity*.
- [303] Y. Huang, A. Rao, *Trends Genet.* **2014**, 30, 464-474, *Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer*.
- [304] A. A. Rawłuszko-Wieczorek, A. Siera, P. P. Jagodziński, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2015**, 96, 425-436, *TET proteins in cancer: Current 'state of the art'*.
- [305] C. A. Larsson, G. Cote, A. Quintas-Cardama, *Mol. Cancer Res.* **2013**, 11, 815-827, *The changing mutational landscape of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome*.

- [306] M. Ko, Y. Huang, A. M. Jankowska, U. J. Pape, M. Tahiliani, H. S. Bandukwala, J. An, E. D. Lamperti, K. P. Koh, R. Ganetzky, X. S. Liu, L. Aravind, S. Agarwal, J. P. Maciejewski, A. Rao, *Nature* **2010**, 468, 839-843, *Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2*.
- [307] C. M. Niemeyer, I. Baumann, *Semin. Hematol.* **2008**, 45, 60-70, *Myelodysplastic syndrome in children and adolescents*.
- [308] Y. Yoshida, *Oncologist* **1996**, 1, 284-287, *Physician Education: Myelodysplastic Syndrome*.
- [309] F. Delhommeau, S. Dupont, V. Della Valle, C. James, S. Trannoy, A. Masse, O. Kosmider, J. P. Le Couedic, F. Robert, A. Alberdi, Y. Lecluse, I. Plo, F. J. Dreyfus, C. Marzac, N. Casadevall, C. Lacombe, S. P. Romana, P. Dessen, J. Soulier, F. Viguie, M. Fontenay, W. Vainchenker, O. A. Bernard, *N. Engl. J. Med.* **2009**, 360, 2289-2301, *Mutation in TET2 in myeloid cancers*.
- [310] K. Moran-Crusio, L. Reavie, A. Shih, O. Abdel-Wahab, D. Ndiaye-Lobry, C. Lobry, Maria E. Figueroa, A. Vasanthakumar, J. Patel, X. Zhao, F. Perna, S. Pandey, J. Madzo, C. Song, Q. Dai, C. He, S. Ibrahim, M. Beran, J. Zavadil, Stephen D. Nimer, A. Melnick, Lucy A. Godley, I. Aifantis, Ross L. Levine, *Cancer Cell* **2011**, 20, 11-24, *Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation*.
- [311] C. Quivoron, L. Couronné, V. Della Valle, Cécile K. Lopez, I. Plo, O. Wagner-Ballon, M. Do Cruzeiro, F. Delhommeau, B. Arnulf, M.-H. Stern, L. Godley, P. Opolon, H. Tilly, E. Solary, Y. Duffourd, P. Dessen, H. Merle-Beral, F. Nguyen-Khac, M. Fontenay, W. Vainchenker, C. Bastard, T. Mercher, Olivier A. Bernard, *Cancer Cell* **2011**, 20, 25-38, *TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis*.
- [312] S. J. Song, L. Poliseno, M. S. Song, U. Ala, K. Webster, C. Ng, G. Beringer, N. J. Brikbak, X. Yuan, L. C. Cantley, A. L. Richardson, P. P. Pandolfi, *Cell* **2013**, 154, 311-324, *MicroRNA-Antagonism Regulates Breast Cancer Stemness and Metastasis via TET-Family-Dependent Chromatin Remodeling*.
- [313] V. Campuzano, L. Montermini, M. D. Molto, L. Pianese, M. Cossee, F. Cavalcanti, E. Monros, F. Rodius, F. Duclos, A. Monticelli, F. Zara, J. Canizares, H. Koutnikova, S. I. Bidichandani, C. Gellera, A. Brice, P. Trouillas, G. De Michele, A. Filla, R. De Frutos, F. Palau, P. I. Patel, S. Di Donato, J. L. Mandel, S. Cocozza, M. Koenig, M. Pandolfo, *Science* **1996**, 271, 1423-1427, *Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion*.
- [314] G. Sadri-Vakili, J. H. Cha, *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2006**, 2, 330-338, *Mechanisms of disease: Histone modifications in Huntington's disease*.
- [315] A. Saveliev, C. Everett, T. Sharpe, Z. Webster, R. Festenstein, *Nature* **2003**, 422, 909-913, *DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing*.
- [316] F. Tassone, R. J. Hagerman, W. D. Chamberlain, P. J. Hagerman, *Am. J. Med. Genet.* **2000**, 97, 195-203, *Transcription of the FMR1 gene in individuals with fragile X syndrome*.
- [317] I. Villar-Menéndez, M. Blanch, S. Tyebji, T. Pereira-Veiga, J. L. Albasanz, M. Martín, I. Ferrer, E. Pérez-Navarro, M. Barrachina, *NeuroMol. Med.* **2013**, 15, 295-309, *Increased 5-Methylcytosine and Decreased 5-Hydroxymethylcytosine Levels are Associated with Reduced Striatal A2AR Levels in Huntington's Disease*.

- [318] F. Wang, Y. Yang, X. Lin, J. Q. Wang, Y. S. Wu, W. Xie, D. Wang, S. Zhu, Y. Q. Liao, Q. Sun, Y. G. Yang, H. R. Luo, C. Guo, C. Han, T. S. Tang, *Hum. Mol. Genet.* **2013**, 22, 3641-3653, *Genome-wide loss of 5-hmC is a novel epigenetic feature of Huntington's disease.*
- [319] B. Yao, L. Lin, R. C. Street, Z. A. Zalewski, J. N. Galloway, H. Wu, D. L. Nelson, P. Jin, *Hum. Mol. Genet.* **2014**, 23, 1095-1107, *Genome-wide alteration of 5-hydroxymethylcytosine in a mouse model of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome.*
- [320] S. Al-Mahdawi, C. Sandi, R. Mouro Pinto, M. A. Pook, *PLoS One* **2013**, 8, e74956, *Friedreich ataxia patient tissues exhibit increased 5-hydroxymethylcytosine modification and decreased CTCF binding at the FXN locus.*
- [321] E. Dong, D. P. Gavin, Y. Chen, J. Davis, *Transl. Psychiatry* **2012**, 2, e159, *Upregulation of TET1 and downregulation of APOBEC3A and APOBEC3C in the parietal cortex of psychotic patients.*
- [322] A. Guidotti, E. Dong, D. P. Gavin, M. Veldic, W. Zhao, D. K. Bhaumik, S. C. Pandey, D. R. Grayson, *Alcohol.: Clin. Exp. Res.* **2013**, 37, 417-424, *DNA Methylation/Demethylation Network Expression in Psychotic Patients with a History of Alcohol Abuse.*
- [323] J. Auta, R. C. Smith, E. Dong, P. Tueting, H. Sershen, S. Boules, A. Lajtha, J. Davis, A. Guidotti, *Schizophr. Res.* **2013**, 150, 312-318, *DNA-methylation gene network dysregulation in peripheral blood lymphocytes of schizophrenia patients.*
- [324] L. Chouliaras, D. Mastroeni, E. Delvaux, A. Grover, G. Kenis, P. R. Hof, H. W. M. Steinbusch, P. D. Coleman, B. P. F. Rutten, D. L. A. van den Hove, *Neurobiol. Aging* **2013**, 34, 2091-2099, *Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients.*
- [325] N. Coppieters, B. V. Dieriks, C. Lill, R. L. Faull, M. A. Curtis, M. Dragunow, *Neurobiol. Aging* **2014**, 35, 1334-1344, *Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain.*
- [326] W. G. Kaelin, Jr., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **2011**, 76, 335-345, *Cancer and altered metabolism: potential importance of hypoxia-inducible factor and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases.*
- [327] K. M. Meldi, M. E. Figueroa, *Pharmacol. Ther.* **2015**, 152, 42-53, *Cytosine modifications in myeloid malignancies.*
- [328] D. Rakheja, S. Konoplev, L. J. Medeiros, W. Chen, *Hum. Pathol.* **2012**, 43, 1541-1551, *IDH mutations in acute myeloid leukemia.*
- [329] L. Dang, D. W. White, S. Gross, B. D. Bennett, M. A. Bittinger, E. M. Driggers, V. R. Fantin, H. G. Jang, S. Jin, M. C. Keenan, K. M. Marks, R. M. Prins, P. S. Ward, K. E. Yen, L. M. Liao, J. D. Rabinowitz, L. C. Cantley, C. B. Thompson, M. G. Vander Heiden, S. M. Su, *Nature* **2009**, 462, 739-744, *Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate.*
- [330] P. S. Ward, J. Patel, D. R. Wise, O. Abdel-Wahab, B. D. Bennett, H. A. Collier, J. R. Cross, V. R. Fantin, C. V. Hedvat, A. E. Perl, J. D. Rabinowitz, M. Carroll, S. M. Su, K. A. Sharp, R. L. Levine, C. B. Thompson, *Cancer Cell* **2010**, 17, 225-234, *The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting α -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate.*
- [331] N. Raimundo, B. E. Baysal, G. S. Shadel, *Trends Mol. Med.* **2011**, 17, 641-649, *Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation.*

- [332] A. King, M. A. Selak, E. Gottlieb, *Oncogene* **2006**, 25, 4675-4682, *Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer*.
- [333] W. M. Linehan, T. A. Rouault, *Clin. Cancer Res.* **2013**, 19, 3345-3352, *Molecular pathways: Fumarate hydratase-deficient kidney cancer--targeting the Warburg effect in cancer*.
- [334] J. A. McGrath, *J. Invest. Dermatol.* **2003**, 121, vii, *Biologic lessons from mutations in the Krebs cycle enzyme, fumarate hydratase*.
- [335] A. Ooi, K. A. Furge, *Chin. J. Cancer* **2012**, 31, 413-420, *Fumarate hydratase inactivation in renal tumors: HIF1 α , NRF2, and "cryptic targets" of transcription factors*.
- [336] M. Sciacovelli, E. Goncalves, T. I. Johnson, V. R. Zecchini, A. S. da Costa, E. Gaude, A. V. Drubbel, S. J. Theobald, S. R. Abbo, M. G. Tran, V. Rajeeve, S. Cardaci, S. Foster, H. Yun, P. Cutillas, A. Warren, V. Gnanapragasam, E. Gottlieb, K. Franze, B. Huntly, E. R. Maher, P. H. Maxwell, J. Saez-Rodriguez, C. Frezza, *Nature* **2016**, *Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition*.
- [337] M. Xiao, H. Yang, W. Xu, S. Ma, H. Lin, H. Zhu, L. Liu, Y. Liu, C. Yang, Y. Xu, S. Zhao, D. Ye, Y. Xiong, K.-L. Guan, *Genes Dev.* **2012**, 26, 1326-1338, *Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors*.
- [338] H. Yang, H. Lin, H. Xu, L. Zhang, L. Cheng, B. Wen, J. Shou, K. Guan, Y. Xiong, D. Ye, *Cell Res.* **2014**, 24, 1017-1020, *TET-catalyzed 5-methylcytosine hydroxylation is dynamically regulated by metabolites*.
- [339] K. Blaschke, K. T. Ebata, M. M. Karimi, J. A. Zepeda-Martinez, P. Goyal, S. Mahapatra, A. Tam, D. J. Laird, M. Hirst, A. Rao, M. C. Lorincz, M. Ramalho-Santos, *Nature* **2013**, 500, 222-226, *Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells*.
- [340] T. A. Hore, F. von Meyenn, M. Ravichandran, M. Bachman, G. Ficiz, D. Oxley, F. Santos, S. Balasubramanian, T. P. Jurkowski, W. Reik, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *Retinol and ascorbate drive erasure of epigenetic memory and enhance reprogramming to naive pluripotency by complementary mechanisms*.
- [341] R. Yin, S.-Q. Mao, B. Zhao, Z. Chong, Y. Yang, C. Zhao, D. Zhang, H. Huang, J. Gao, Z. Li, Y. Jiao, C. Li, S. Liu, D. Wu, W. Gu, Y.-G. Yang, G.-L. Xu, H. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 10396-10403, *Ascorbic Acid Enhances Tet-Mediated 5-Methylcytosine Oxidation and Promotes DNA Demethylation in Mammals*.
- [342] E. A. Minor, B. L. Court, J. I. Young, G. Wang, *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 13669-13674, *Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine*.
- [343] J. Cheng, S. Guo, S. Chen, Stephen J. Mastriano, C. Liu, Ana C. D'Alessio, E. Hysolli, Y. Guo, H. Yao, Cynthia M. Megyola, D. Li, J. Liu, W. Pan, Christine A. Roden, X.-L. Zhou, K. Heydari, J. Chen, I.-H. Park, Y. Ding, Y. Zhang, J. Lu, *Cell Rep.* **2013**, 5, 471-481, *An Extensive Network of TET2-Targeting MicroRNAs Regulates Malignant Hematopoiesis*.
- [344] X. Fu, L. Jin, X. Wang, A. Luo, J. Hu, X. Zheng, W. M. Tsark, A. D. Riggs, H. T. Ku, W. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, 110, 17892-17897, *MicroRNA-26a targets ten eleven translocation enzymes and is regulated during pancreatic cell differentiation*.

- [345] S. Morita, T. Horii, M. Kimura, T. Ochiya, S. Tajima, I. Hatada, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 14647-14658, *miR-29 represses the activities of DNA methyltransferases and DNA demethylases*.
- [346] S. J. Song, K. Ito, U. Ala, L. Kats, K. Webster, S M. Sun, M. Jongen-Lavrencic, K. Manova-Todorova, J. Teruya-Feldstein, D E. Avigan, R. Delwel, P P. Pandolfi, *Cell Stem Cell* **2013**, *13*, 87-101, *The Oncogenic MicroRNA miR-22 Targets the TET2 Tumor Suppressor to Promote Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Transformation*.
- [347] C. Bauer, K. Gobel, N. Nagaraj, C. Colantuoni, M. Wang, U. Muller, E. Kremmer, A. Rottach, H. Leonhardt, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 4801-4812, *Phosphorylation of TET proteins is regulated via O-GlcNAcylation by the O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT)*.
- [348] A. Balasubramani, A. Rao, *Mol. Cell* **2013**, *49*, 618-619, *O-GlcNAcylation and 5-methylcytosine oxidation: an unexpected association between OGT and TETs*.
- [349] Q. Zhang, X. Liu, W. Gao, P. Li, J. Hou, J. Li, J. Wong, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 5986-5996, *Differential regulation of the ten-eleven translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase (OGT)*.
- [350] T. Nakagawa, L. Lv, M. Nakagawa, Y. Yu, C. Yu, A. C. D'Alessio, K. Nakayama, H. Y. Fan, X. Chen, Y. Xiong, *Mol. Cell* **2015**, *57*, 247-260, *CRL4(VprBP) E3 ligase promotes monoubiquitylation and chromatin binding of TET dioxygenases*.
- [351] G. W. Hart, C. Slawson, G. Ramirez-Correa, O. Lagerlof, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 825-858, *Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease*.
- [352] A. Balasubramani, A. Rao, *Mol. Cell* **2013**, *49*, 618-619, *O-GlcNAcylation and 5-Methylcytosine Oxidation: An Unexpected Association between OGT and TETs*.
- [353] R. Ito, S. Katsura, H. Shimada, H. Tsuchiya, M. Hada, T. Okumura, A. Sugawara, A. Yokoyama, *Genes Cells* **2014**, *19*, 52-65, *TET3-OGT interaction increases the stability and the presence of OGT in chromatin*.
- [354] Y. Arioka, A. Watanabe, K. Saito, Y. Yamada, *PLoS One* **2012**, *7*, e45031, *Activation-induced cytidine deaminase alters the subcellular localization of Tet family proteins*.
- [355] C. Bian, X. Yu, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 2893-2905, *PGC7 suppresses TET3 for protecting DNA methylation*.
- [356] T. Nakamura, Y.-J. Liu, H. Nakashima, H. Umehara, K. Inoue, S. Matoba, M. Tachibana, A. Ogura, Y. Shinkai, T. Nakano, *Nature* **2012**, *486*, 415-419, *PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos*.
- [357] R. Chen, Q. Zhang, X. Duan, P. York, G.-D. Chen, P. Yin, H. Zhu, M. Xu, P. Chen, Q. Wu, D. Li, J. Samarut, G. Xu, P. Zhang, X. Cao, J. Li, J. Wong, *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 4533-4543, *The 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC) Reader UHRF2 Is Required for Normal Levels of 5hmC in Mouse Adult Brain and Spatial Learning and Memory*.
- [358] T. Berggård, S. Linse, P. James, *Proteomics* **2007**, *7*, 2833-2842, *Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions*.
- [359] J. Cox, M. Y. Hein, C. A. Luber, I. Paron, N. Nagaraj, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13*, 2513-2526, *Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ*.

- [360] S. Nahnsen, C. Bielow, K. Reinert, O. Kohlbacher, *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, 12, 549-556, *Tools for label-free peptide quantification*.
- [361] J. S. Bonifacino, E. C. Dell'Angelica, T. A. Springer, *John Wiley & Sons, Inc.*, **2001**.
- [362] B. Kaboord, M. Perr, *Methods Mol. Biol.* **2008**, 424, 349-364, *Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation*.
- [363] S. C. Masters, *Methods Mol. Biol.* **2004**, 261, 337-350, *Co-immunoprecipitation from transfected cells*.
- [364] J. LaCava, K. R. Molloy, M. S. Taylor, M. Domanski, B. T. Chait, M. P. Rout, *BioTechniques* **2015**, 58, 103-119, *Affinity proteomics to study endogenous protein complexes: pointers, pitfalls, preferences and perspectives*.
- [365] T. J. Gibson, M. Seiler, R. A. Veitia, *Nat. Methods* **2013**, 10, 715-721, *The transience of transient overexpression*.
- [366] A. Bradbury, A. Pluckthun, *Nature* **2015**, 518, 27-29, *Reproducibility: Standardize antibodies used in research*.
- [367] J. R. Couchman, *J. Histochem. Cytochem.* **2009**, 57, 7-8, *Commercial antibodies: the good, bad, and really ugly*.
- [368] M. Wadman, *Nature* **2013**, 500, 14-16, *NIH mulls rules for validating key results*.
- [369] M. Walhout, M. Vidal, J. Dekker, *Academic Press*, **2012**, *Handbook of systems biology: concepts and insights*.
- [370] M. R. Emmett, R. M. Caprioli, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, 5, 605-613, *Micro-electrospray mass spectrometry: ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins*.
- [371] H. Budzikiewicz, M. Schäfer, *John Wiley & Sons*, **2012**, *Massenspektrometrie: eine Einführung*.
- [372] M. S. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, 136, 167-180, *Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?*
- [373] Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. Graham Cooks, *J. Mass Spectrom.* **2005**, 40, 430-443, *The Orbitrap: a new mass spectrometer*.
- [374] A. Makarov, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1156-1162, *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis*.
- [375] J. M. Wells, S. A. McLuckey, *Methods Enzymol.* **2005**, 402, 148-185, *Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins*.
- [376] S. Tyanova, T. Temu, J. Cox, *Nat. Protoc.* **2016**, 11, 2301-2319, *The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics*.
- [377] K. Breuker, M. Jin, X. Han, H. Jiang, F. W. McLafferty, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, 19, 1045-1053, *Top-down identification and characterization of biomolecules by mass spectrometry*.
- [378] J. C. Tran, L. Zamdborg, D. R. Ahlf, J. E. Lee, A. D. Catherman, K. R. Durbin, J. D. Tipton, A. Vellaichamy, J. F. Kellie, M. Li, C. Wu, S. M. Sweet, B. P. Early, N. Siuti, R. D. LeDuc, P. D.

- Compton, P. M. Thomas, N. L. Kelleher, *Nature* **2011**, 480, 254-258, *Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics*.
- [379] K. A. Resing, N. G. Ahn, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 885-889, *Proteomics strategies for protein identification*.
- [380] M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, B. Kuster, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 389, 1017-1031, *Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review*.
- [381] N. Dephoure, S. P. Gygi, *Sci. Signaling* **2012**, 5, rs2-rs2, *Hyperplexing: A Method for Higher-Order Multiplexed Quantitative Proteomics Provides a Map of the Dynamic Response to Rapamycin in Yeast*.
- [382] P. V. Bondarenko, D. Chelius, T. A. Shaler, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4741-4749, *Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry*.
- [383] J. Gao, G. J. Opiteck, M. S. Friedrichs, A. R. Dongre, S. A. Hefta, *J. Proteome Res.* **2003**, 2, 643-649, *Changes in the protein expression of yeast as a function of carbon source*.
- [384] H. Liu, R. G. Sadygov, J. R. Yates, 3rd, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 4193-4201, *A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics*.
- [385] M. M. Matzke, J. N. Brown, M. A. Gritsenko, T. O. Metz, J. G. Pounds, K. D. Rodland, A. K. Shukla, R. D. Smith, K. M. Waters, J. E. McDermott, B. J. Webb-Robertson, *Proteomics* **2013**, 13, 493-503, *A comparative analysis of computational approaches to relative protein quantification using peptide peak intensities in label-free LC-MS proteomics experiments*.
- [386] W. M. Old, K. Meyer-Arendt, L. Aveline-Wolf, K. G. Pierce, A. Mendoza, J. R. Sevinisky, K. A. Resing, N. G. Ahn, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, 4, 1487-1502, *Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics*.
- [387] H. Choi, T. Glatter, M. Gstaiger, A. I. Nesvizhskii, *J. Proteome Res.* **2012**, 11, 2619-2624, *SAINT-MS1: protein-protein interaction scoring using label-free intensity data in affinity purification-mass spectrometry experiments*.
- [388] E. C. Keilhauer, M. Y. Hein, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, 14, 120-135, *Accurate protein complex retrieval by affinity enrichment mass spectrometry (AE-MS) rather than affinity purification mass spectrometry (AP-MS)*.
- [389] X. Hu, L. Zhang, S.-Q. Mao, Z. Li, J. Chen, R.-R. Zhang, H.-P. Wu, J. Gao, F. Guo, W. Liu, *Cell Stem Cell* **2014**, 14, 512-522, *Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming*.
- [390] I. Guillemin, M. Becker, K. Ociepka, E. Friauf, H. G. Nothwang, *Proteomics* **2005**, 5, 35-45, *A subcellular prefractionation protocol for minute amounts of mammalian cell cultures and tissue*.
- [391] K. V. Murty, R. Pal, K. Datta, D. Mal, *Synth. Commun.* **1994**, 24, 1287-1292, *Glucose Promoted Claisen Rearrangement of 1-Allyloxy anthraquinones*.
- [392] H. Sharghi, G. Aghapour, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 2813-2815, *Claisen rearrangement of allyloxanthraquinones with silver/potassium iodide in acetic acid as a new and efficient reagent*.

- [393] T. Kleppisch, A. Pfeifer, P. Klatt, P. Ruth, A. Montkowski, R. Fässler, F. Hofmann, *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 48-55, *Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase.*
- [394] S. Michalakis, T. Kleppisch, S. Polta, C. Wotjak, S. Koch, G. Rammes, L. Matt, E. Becirovic, M. Biel, *Genes, Brain Behav.* **2011**, *10*, 137-148, *Altered synaptic plasticity and behavioral abnormalities in CNGA3-deficient mice.*
- [395] N. A. Kulak, G. Pichler, I. Paron, N. Nagaraj, M. Mann, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 319-324, *Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells.*
- [396] K. Williams, J. Christensen, M. T. Pedersen, J. V. Johansen, P. A. Cloos, J. Rappsilber, K. Helin, *Nature* **2011**, *473*, *TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity.*
- [397] C. Jin, Y. Lu, J. Jelinek, S. Liang, M. R. Estecio, M. C. Barton, J.-P. J. Issa, *Nucleic Acids Res.* **2014**, gku372, *TET1 is a maintenance DNA demethylase that prevents methylation spreading in differentiated cells.*
- [398] Y. Xu, F. Wu, L. Tan, L. Kong, L. Xiong, J. Deng, A. J. Barbera, L. Zheng, H. Zhang, S. Huang, J. Min, T. Nicholson, T. Chen, G. Xu, Y. Shi, K. Zhang, Y. G. Shi, *Mol. Cell* **2011**, *42*, *Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells.*
- [399] J. Ding, X. Huang, N. Shao, H. Zhou, D.-F. Lee, F. Faiola, M. Fidalgo, D. Guallar, A. Saunders, P. V. Shliha, *Cell Stem Cell* **2015**, *16*, 653-668, *Tex10 coordinates epigenetic control of super-enhancer activity in pluripotency and reprogramming.*
- [400] J. Ding, H. Xu, F. Faiola, A. Ma'ayan, J. Wang, *Cell Res.* **2012**, *22*, 155-167, *Oct4 links multiple epigenetic pathways to the pluripotency network.*
- [401] H. Takai, K. Masuda, T. Sato, Y. Sakaguchi, T. Suzuki, T. Suzuki, R. Koyama-Nasu, Y. Nasu-Nishimura, Y. Katou, H. Ogawa, *Cell Rep.* **2014**, *9*, 48-60, *5-Hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the CHTOP-methylosome complex.*
- [402] S. Xue, C. Liu, X. Sun, W. Li, C. Zhang, X. Zhou, Y. Lu, J. Xiao, C. Li, X. Xu, *Cell Rep.* **2016**, *16*, 1096-1105, *TET3 Inhibits Type I IFN Production Independent of DNA Demethylation.*
- [403] H. Garcia, D. Fleyshman, K. Kolesnikova, A. Safina, M. Commane, G. Paszkiewicz, A. Omelian, C. Morrison, K. Gurova, *Oncotarget* **2011**, *2*, 783-796, *Expression of FACT in mammalian tissues suggests its role in maintaining of undifferentiated state of cells.*
- [404] C. W. Lio, J. Zhang, E. Gonzalez-Avalos, P. G. Hogan, X. Chang, A. Rao, *eLife* **2016**, *5*, *Tet2 and Tet3 cooperate with B-lineage transcription factors to regulate DNA modification and chromatin accessibility.*
- [405] K. Ahmed, H. Dehghani, P. Rugg-Gunn, E. Fussner, J. Rossant, D. P. Bazett-Jones, *PLoS One* **2010**, *5*, e10531, *Global chromatin architecture reflects pluripotency and lineage commitment in the early mouse embryo.*
- [406] S. Efroni, R. Duttagupta, J. Cheng, H. Dehghani, D. J. Hoepfner, C. Dash, D. P. Bazett-Jones, S. Le Grice, R. D. McKay, K. H. Buetow, *Cell Stem Cell* **2008**, *2*, 437-447, *Global transcription in pluripotent embryonic stem cells.*

- [407] E. Meshorer, D. Yellajoshula, E. George, P. J. Scambler, D. T. Brown, T. Misteli, *Dev. Cell* **2006**, *10*, 105-116, *Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells*.
- [408] K. P. Koh, A. Yabuuchi, S. Rao, Y. Huang, K. Cunliffe, J. Nardone, A. Laiho, M. Tahiliani, C. A. Sommer, G. Mostoslavsky, L. Lahesmaa, S. H. Orkin, S. J. Rodig, G. Q. Daley, A. Rao, *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, *Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells*.
- [409] A. A. Sérandour, S. Avner, F. Oger, M. Bizot, F. Percevault, C. Lucchetti-Miganeh, G. Palierne, C. Gheeraert, F. Barloy-Hubler, C. Le Péron, *Nucleic Acids Res.* **2012**, gks595, *Dynamic hydroxymethylation of deoxyribonucleic acid marks differentiation-associated enhancers*.
- [410] B. W. Carey, L. W. Finley, J. R. Cross, C. D. Allis, C. B. Thompson, *Nature* **2015**, *518*, 413-416, *Intracellular [agr]-ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells*.
- [411] B. S. Meldrum, *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1007S-1015S, *Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology*.
- [412] S. Fredriksson, M. Gullberg, J. Jarvius, C. Olsson, K. Pietras, S. M. Gústafsdóttir, A. Östman, U. Landegren, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 473-477, *Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays*.
- [413] L. Jin, D. Li, G. N. Alesi, J. Fan, H.-B. Kang, Z. Lu, T. J. Boggon, P. Jin, H. Yi, E. R. Wright, *Cancer Cell* **2015**, *27*, 257-270, *Glutamate dehydrogenase 1 signals through antioxidant glutathione peroxidase 1 to regulate redox homeostasis and tumor growth*.
- [414] T. Nishino, K. Morikawa, *Oncogene* **2002**, *21*, 9022, *Structure and function of nucleases in DNA repair: shape, grip and blade of the DNA scissors*.
- [415] E. S. Henle, S. Linn, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 19095-19098, *Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide*.
- [416] M. Pitié, G. v. Pratviel, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1018-1059, *Activation of DNA carbon-hydrogen bonds by metal complexes*.
- [417] D. R. Lloyd, D. H. Phillips, *Mutat. Res.* **1999**, *424*, 23-36, *Oxidative DNA damage mediated by copper (II), iron (II) and nickel (II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links*.
- [418] A. C. Mello-Filho, R. Meneghini, *Mutat. Res.* **1991**, *251*, 109-113, *Iron is the intracellular metal involved in the production of DNA damage by oxygen radicals*.
- [419] W. K. Pogozelski, T. D. Tullius, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1089-1108, *Oxidative strand scission of nucleic acids: routes initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety*.
- [420] T. Laukka, C. J. Mariani, T. Ihanola, J. Z. Cao, J. Hokkanen, W. G. Kaelin, L. A. Godley, P. Koivunen, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 4256-4265, *Fumarate and succinate regulate expression of hypoxia-inducible genes via TET enzymes*.
- [421] A. Aitken, *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 162-172, *14-3-3 proteins: a historic overview*.

- [422] G. C. Hon, C.-X. Song, T. Du, F. Jin, S. Selvaraj, A. Y. Lee, C.-a. Yen, Z. Ye, S.-Q. Mao, B.-A. Wang, *Mol. Cell* **2014**, *56*, 286-297, *5mC oxidation by Tet2 modulates enhancer activity and timing of transcriptome reprogramming during differentiation*.
- [423] T. B. van Dijk, N. Gillemans, C. Stein, P. Fanis, J. Demmers, M. van de Corput, J. Essers, F. Grosveld, U. M. Bauer, S. Philipsen, *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 260-272, *Friend of Prmt1, a novel chromatin target of protein arginine methyltransferases*.
- [424] M. Ohno, J. Komakine, E. Suzuki, M. Nishizuka, S. Osada, M. Imagawa, *Biochem. J.* **2011**, *437*, 531-540, *Interleukin enhancer-binding factor 3 functions as a liver receptor homologue-1 co-activator in synergy with the nuclear receptor co-activators PRMT1 and PGC-1 α* .
- [425] J. Tang, P. N. Kao, H. R. Herschman, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 19866-19876, *Protein-arginine methyltransferase I, the predominant protein-arginine methyltransferase in cells, interacts with and is regulated by interleukin enhancer-binding factor 3*.
- [426] M. Vermeulen, H. C. Eberl, F. Matarese, H. Marks, S. Denissov, F. Butter, K. K. Lee, J. V. Olsen, A. A. Hyman, H. G. Stunnenberg, M. Mann, *Cell* **2010**, *142*, 967-980, *Quantitative Interaction Proteomics and Genome-wide Profiling of Epigenetic Histone Marks and Their Readers*.
- [427] W. J. Law, K. L. Cann, G. G. Hicks, *Briefings Funct. Genomics Proteomics* **2006**, *5*, 8-14, *TLS, EWS and TAF15: a model for transcriptional integration of gene expression*.
- [428] D. Mellacheruvu, Z. Wright, A. L. Couzens, J.-P. Lambert, N. A. St-Denis, T. Li, Y. V. Miteva, S. Hauri, M. E. Sardi, T. Y. Low, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 730-736, *The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data*.

8. Anhang

Tabelle 8.1: Auswahl an GO-Begriffen für die Proteine der grünen Box der *Cluster*-Analyse in Abbildung 4.4.

GO-Begriff	Proteinanzahl GO-Begriff	% (Anzahl GO-Begriff / gesamte Liste)	p-Wert
BP: Genexpression	8	80	3.4×10^{-3}
CC: Chromosom	3	30	7.1×10^{-2}
MF: Nukleinsäurebindung	8	80	9.0×10^{-4}
MF: Proteinbindung	8	80	5.4×10^{-2}

Für eine Auswahl an GO-Begriffen sind die p-Werte und die Anzahl der Proteine gegeben, welche für diesen GO-Begriff angereichert sind. Zudem ist das Verhältnis von der Anzahl dieser Proteine im Vergleich zur Proteinanzahl der gesamten Liste in Prozent aufgelistet. BP = biologischer Prozess, CC = zelluläres Kompartiment, MF = molekulare Funktion

Tabelle 8.2: Auswahl an GO-Begriffen für die Proteine der cyanblauen Box der *Cluster*-Analyse in Abbildung 4.4.

GO-Begriff	Proteinanzahl GO-Begriff	% (Anzahl GO-Begriff / gesamte Liste)	p-Wert
CC: Nukleus	9	90	1.2×10^{-3}
MF: Nukleinsäurebindung	9	90	6.6×10^{-5}

Für eine Auswahl an GO-Begriffen sind die p-Werte und die Anzahl der Proteine gegeben, welche für diesen GO-Begriff angereichert sind. Zudem ist das Verhältnis von der Anzahl dieser Proteine im Vergleich zur Proteinanzahl der gesamten Liste in Prozent aufgelistet. BP = biologischer Prozess, CC = zelluläres Kompartiment, MF = molekulare Funktion

Tabelle 8.3: Auswahl an GO-Begriffen für die Proteine der violetten Box der *Cluster*-Analyse in Abbildung 4.4.

GO-Begriff	Proteinanzahl GO-Begriff	% (Anzahl GO-Begriff / gesamte Liste)	p-Wert
BP: Chromatinumstrukturierung	2	29	4.2×10^{-2}
CC: Chromosom	4	57	2.2×10^{-3}
MF: Transkriptionscoaktivatoraktivität	3	43	5.5×10^{-4}

Für eine Auswahl an GO-Begriffen sind die p-Werte und die Anzahl der Proteine gegeben, welche für diesen GO-Begriff angereichert sind. Zudem ist das Verhältnis von der Anzahl dieser Proteine im Vergleich zur Proteinanzahl der gesamten Liste in Prozent aufgelistet. BP = biologischer Prozess, CC = zelluläres Kompartiment, MF = molekulare Funktion

Tabelle 8.4: Auswahl an GO-Begriffen für die Proteine der roten Box der *Cluster*-Analyse in Abbildung 4.4.

GO-Begriff	Proteinanzahl GO-Begriff	% (Anzahl GO-Begriff / gesamte Liste)	p-Wert
BP: Genexpression	7	88	3.1×10^{-3}
CC: Nukleus	2	88	7.8×10^{-3}
MF: DNA-Bindung	4	50	4.5×10^{-2}

Für eine Auswahl an GO-Begriffen sind die p-Werte und die Anzahl der Proteine gegeben, welche für diesen GO-Begriff angereichert sind. Zudem ist das Verhältnis von der Anzahl dieser Proteine im Vergleich zur Proteinanzahl der gesamten Liste in Prozent aufgelistet. BP = biologischer Prozess, CC = zelluläres Kompartiment, MF = molekulare Funktion

Tabelle 8.5: Log₂(GFP-Tet/GFP)-Werte der Komponenten der Chromatin-modifizierenden Komplexe, die mehr als zweifach angereichert und einen p-Wert < 0.05 in mindestens einer der Tet-Co-IPs im Vergleich zur Kontrolle haben.

Komplex-komponente	Tet1 Co-IP mESC	Tet3 ^{-CXXC} Co-IP mESC	Tet3 Co-IP mESC	Tet3 Co-IP NPC	Tet3 ^{-CXXC} Co-IP NPC
Actl6a	positiv	1.34	positiv	negativ	negativ
Arid1a	positiv	0.92	1.67	negativ	negativ
Dmap1	positiv	3.00	1.84	positiv	positiv
Hdac2	positiv	2.23	negativ	1.98	1.98
Mbd3	1.11	positiv	negativ	positiv	1.92
Mta3	positiv	1.66	3.20	negativ	negativ
Ppp1cc	negativ	1.84	1.99	negativ	negativ
Rbbp7	positiv	2.39	3.02	positiv	3.25
Ruvbl2	0.99	0.86	1.07	negativ	negativ
Smarcc1	0.62	0.99	0.89	positiv	positiv
Tox4	positiv	negativ	negativ	1.09	positiv
Wdr82	positiv	positiv	1.69	positiv	3.09
Ruvbl1	positiv	1.34	positiv	negativ	negativ
Morf4l1	positiv	1.63	negativ	negativ	positiv
Ppp1ca	0.83	1.31	0.87	negativ	positiv
Rbbp4	1.08	1.51	0.94	positiv	positiv
Mta2	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv
Ppp1r12a	neg	negativ	negativ	positiv	positiv
Smarcd1	0.51	0.83	positiv	negativ	positiv
Smarcc2	2.24	negativ	positiv	negativ	positiv
Smarca4	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv
Ppp1r10	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ
Smarchb1	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ
Gatad2a	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv
Chd4	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Mta1	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Hdac1	positiv	positiv	negativ	positiv	2.57
Meaf6	positiv	2.27	negativ	positiv	positiv
Smarce1	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Supt16	positiv	positiv	negativ	1.75	2.36
Ssrp1	positiv	1.42	positiv	1.86	1.84

Die log₂(GFP-Tet/GFP)-Werte für die Tet1-, Tet3- und Tet3^{-CXXC}-Co-IPs in mESCs und NPCs sind gegeben.

Tabelle 8.6: Tet-normalisierte Werte der Komponenten der Chromatin-modifizierenden Komplexe, die mehr als zweifach angereichert und einen p-Wert < 0.05 in mindestens einer der Tet-Co-IPs im Vergleich zur Kontrolle haben.

Komplex-komponente	Tet1 mESC normalisiert	Tet3 ^{-CXXC} mESC normalisiert	Tet3 mESC normalisiert	Tet3 NPC normalisiert	Tet3 ^{-CXXC} NPC normalisiert
Ppp1cc		0.30	0.28		
Actl6a		0.22			
Arid1a		0.15	0.24		
Dmap1		0.48	0.26		
Hdac2		0.36		0.21	0.21
Mbd3	0.12				0.20
Mta3		0.27	0.45		
Rbbp7		0.38	0.43		0.34
Ruvbl2	0.10	0.14	0.15		
Smarcc1	0.06	0.16	0.13		
Tox4				0.12	
Wdr82			0.24		0.32
Ruvbl1		0.22			
Morf4l1		0.26			
Ppp1ca	0.09	0.21	0.12		
Rbbp4	0.11	0.24	0.13		
Smarcc2	0.23				
Smarcd1	0.05	0.13			
Meaf6		0.37			
Ssrp1		0.23		0.20	0.19
Supt16				0.19	0.24

Die normalisierten Werte der Tet1-, Tet3- und Tet3^{-CXXC}-Co-IPs in mESCs und NPCs wurden berechnet, indem der log2-Wert der Komplexkomponente durch den log2-Wert von Tet1, Tet3 oder Tet3^{-CXXC} dividiert wurde.

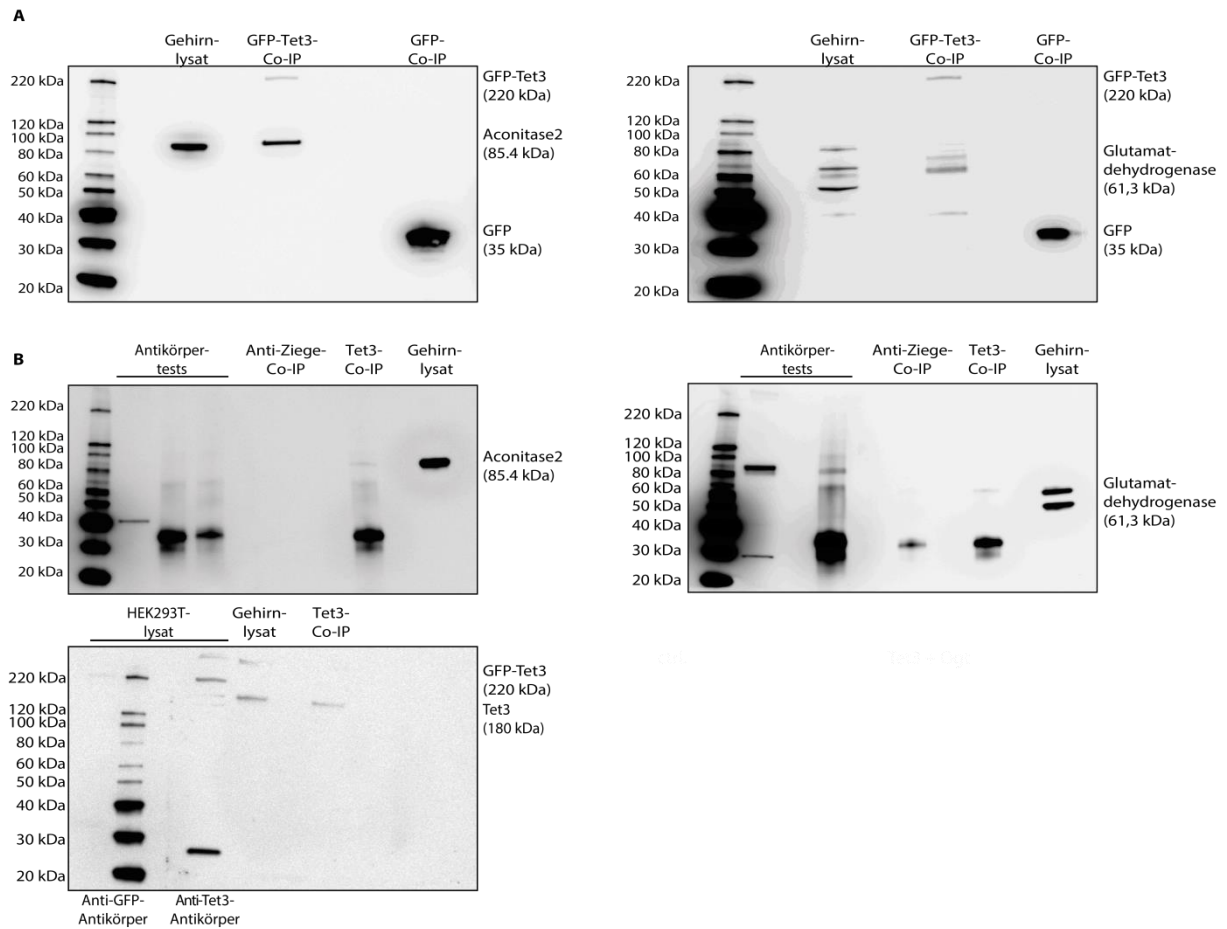


Abbildung 8.1: Komplette Western Blots der GFP-Tet3-gesättigten und endogenen Co-Immunpräzipitationen (Co-IPs). (A) Western Blots nach GFP-Tet3-gesättigter Co-IP unter Verwendung von Anti-Aconitase2- und Anti-Glutamatdehydrogenase(Glud)-Antikörper. (B) Western Blots nach endogener Tet3-Co-IP unter Verwendung von Anti-Aconitase2-, Anti-Glud- und Anti-Tet3-Antikörper. Anti-GFP-Antikörper wurden verwendet, um GFP-Tet3 in HEK293T-Zelllysat nachzuweisen.

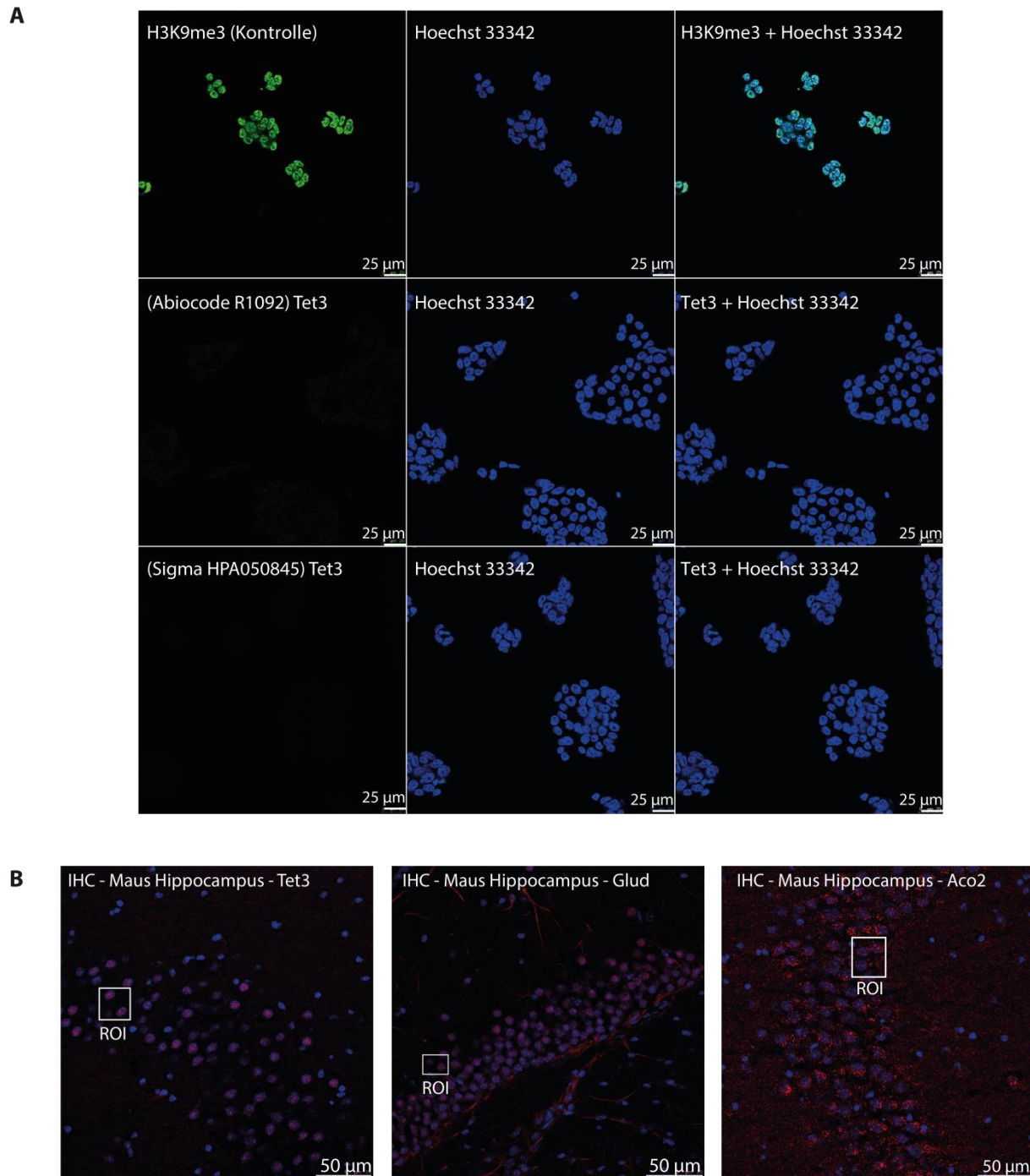


Abbildung 8.2: Fluoreszenzmikroskopiedaten. (A) Test der Anti-Tet3-Antikörper von Abiocode und Sigma in Tet1-3 dreifach ausgeschalteten (TKO) murinen embryonalen Stammzellen. Der Chromatinmarker H3K9me3 diente als Positivkontrolle, um zu zeigen, dass die Immuncytochemie (ICC) generell funktioniert. Für alle drei ICCs wurde derselbe Sekundärantikörper verwendet. (B) Überblick über die Hippocampus-Regionen der mit Antikörpern gegen Tet3, Glutamatdehydrogenase (Glud) oder Aconitase 2 (Aco2) durchgeführten Immunhistochemie. Der Bereich von Interesse (*region of interest*, ROI) ist weiß umrandet und markiert den Ausschnitt, der für die Nahaufnahmen in Abbildung 4.15A verwendet wurden.

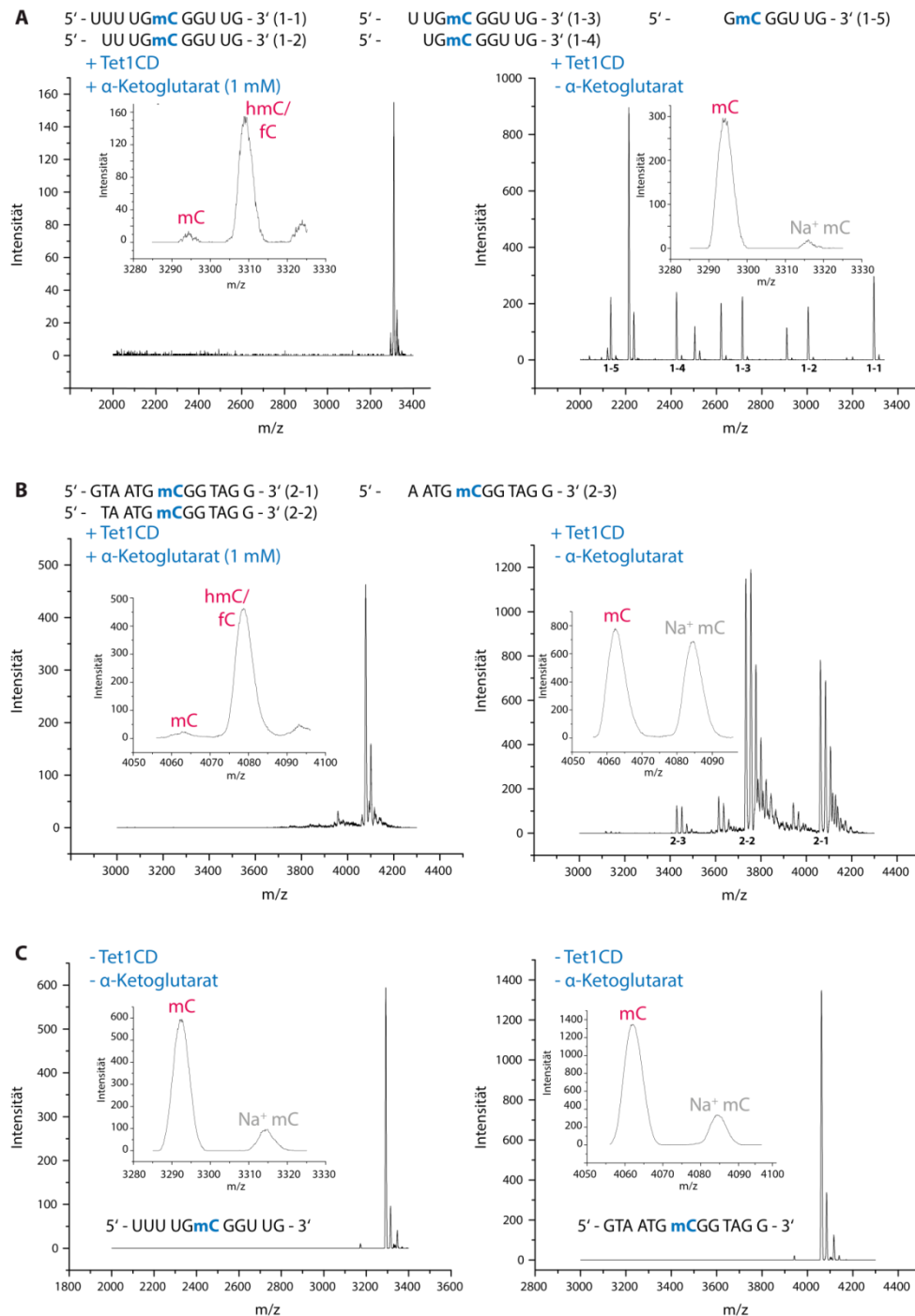


Abbildung 8.3: Die Aktivität der katalytischen Domäne von Tet1 (Tet1CD) in Gegenwart und Abwesenheit des Cosubstrats. (A) Tet1CD zeigt in Gegenwart von α -Ketoglutarat volle Aktivität im Reaktionspuffer (DNA-Oligo: 5'-UUU UGmC GGU UG-3'; MALDI-TOF m/z mC: 3294.5; hmC/fC: 3310.8). Wenn nur Fe(II) und Tet1CD vorhanden sind, wird der DNA-Oligo hydrolysiert: 1-1 3294.5 Da; 1-2 3004.8 Da; 1-3 2714.6 Da; 1-4: 2424.4 Da; 1-5: 2134.3 Da. (B) Tet1CD zeigt ebenso Aktivität an dem DNA-Oligo 5'-GTA ATG mC GG TAG G-3'. Die MALDI-TOF-Analyse detektiert einen kleinen Peak der mC- (4066 m/z) und einen großen Peak der hmC/fC-enthaltenden DNA (4082 m/z). Ist kein Cosubstrat vorhanden, wird das Oligomer ebenfalls hydrolysiert: 2-1 4066.6 Da; 2-2 3737.3 Da; 2-3: 3431.1 Da. Allerdings tritt die Degradation in geringerem Maße auf. (C) Wenn kein Tet-Enzym vorhanden ist, sind in der Gegenwart von Fe(II) beide DNA-Oligomere in Wasser stabil.